

# REMERCIEMENTS

---

Au terme de ce mémoire, j'aimerais remercier ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidée à le réaliser.

Premièrement, je tiens à remercier mes promoteurs, Vincent Baeten et Yvan Larondelle pour m'avoir permise de m'évader de l'enceinte de l'UCL pour réaliser mon mémoire au CRA-W. Merci plus particulièrement à Vincent Baeten de m'avoir guidée tout au long de mon stage mais aussi de m'avoir si bien accueillie.

Merci également à Anne Legrève, Philippe Vermeulen et Raphaël Robiette pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour avoir su adapter leur agenda.

Je voudrais également remercier Olivier Pigeon et son équipe, plus particulièrement Patricia Devos et Aurore Dineur, de m'avoir accueillie dans leur laboratoire et de m'avoir accompagnée lors de mes analyses chromatographiques ainsi que dans la relecture de cette partie.

Mes remerciements vont ensuite à Philippe, pour m'avoir suivie et conseillée tout au long de l'année. Je te suis très reconnaissante de tout le temps que tu m'as consacré.

Je voudrais également remercier Charlotte Bataille, Guillaume Jacquemin et Olivier Pigeon pour m'avoir fourni les semences traitées, les matières actives et les formulations de pesticides.

Pour leur aide précieuse lors des analyses spectrales et statistique, merci à Ouissam Abbas et à Juan Antonia Fernandez Pierna. Merci également à Quentin, Nicaise et Bernard pour m'avoir appris à utiliser les instruments infrarouges. Merci à eux d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe du CRA-W, en particulier Damien, Alexandre, Quentin et Nicaise pour m'avoir fait une place dans leur bureau et d'avoir égayé mes journées, vous avez été d'un réel soutien.

Merci à Elise, Roxane et maman pour avoir relu et corrigé mon orthographe et à Julie pour son aide précieuse lors de la traduction du résumé. Un grand merci à vous.

Enfin, je terminerai par remercier du fond cœur ma famille qui m'a soutenue pendant la rédaction de ce travail, mais également pendant toutes ces années universitaires. Vous êtes une famille formidable.

## RÉSUMÉ FRANÇAIS

---

Une bonne qualité du traitement des semences nécessite que les matières actives soient réparties à la dose cible et de manière homogène sur les semences d'un même lot. En effet, un sous-dosage peut entraîner une protection insuffisante des semences alors qu'un surdosage peut accroître le risque de phytotoxicité pour les semences et constituer une perte économique pour le producteur de semences traitées.

Des méthodes chromatographiques sont couramment utilisées pour évaluer cette qualité. Ces méthodes sont sélectives, sensibles, précises et répétables, mais également longues, coûteuses, destructives et nécessitent une quantité importante de solvant. À la fois rapide, non destructive et ne nécessitant pas de préparation d'échantillons ni de solvant, la spectroscopie proche infrarouge semble être une alternative intéressante pour la détermination de la qualité du traitement des semences.

L'objectif du travail est d'étudier la qualité du traitement de semences par imagerie hyperspectrale proche infrarouge, permettant d'analyser simultanément plusieurs semences, en comparaison avec les résultats obtenus sur un instrument de spectrométrie proche infrarouge (SPIR) classique et sur un instrument de chromatographie. Trois critères ont été étudiés : l'identification du type de pesticide appliqué, l'homogénéité entre lots de semence sur base du dosage moyen des pesticides et l'homogénéité de traitement entre semences d'un même lot.

Les modèles de discrimination en dosage moyen permettent de classer les échantillons ou les semences en fonction de l'espèce (blé, orge, épeautre) et du statut traité/non traité avec une sensibilité proche de 100 %, quel que soit la méthode analytique utilisée. La discrimination des groupes de pesticides permet dans le meilleur des cas de discriminer deux groupes sur trois avec une sensibilité de 100 %.

Les analyses en chromatographie liquide à ultra performance, en spectroscopie proche infrarouge classique et en imagerie hyperspectrale proche infrarouge ont montré l'hétérogénéité du traitement de semences, aussi bien entre les lots de semences qu'entre les semences d'un même lot. En effet, 54 % des lots de semences traitées avec la formulation Kinto Duo et 94 % avec le Redigo présentent des teneurs moyennes en matières actives dépassant les 30 % acceptables autour de la dose cible. Les analyses en dosage semence par semence ont également montré des variations entre les semences d'un même lot nettement supérieures aux 25 % préconisés. Les modèles établis à partir des spectres infrarouges ne permettent pas une analyse quantitative des teneurs en matières actives. Néanmoins, certains modèles sont capables de classer les échantillons en sous-dosés et surdosés, pour les deux méthodes infrarouges. Aussi l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge est capable de distinguer les zones traitées et non traitées au sein d'une semence.

Ces nouvelles applications en spectroscopie proche infrarouge ouvrent des perspectives d'avenir pour le contrôle de la qualité du traitement des semences.

## RÉSUMÉ ANGLAIS

---

A good quality of seeds treatment needs the active substances to be evenly distributed to the target dose and on the same seed lot. An under-dosage can indeed lead to an insufficient protection of the seeds and an over-dosage can increase the risk of phytotoxicity and represent an economic loss for the producer of the treated seeds.

Chromatographic methods are often used to evaluate this quality. These methods are selective, sensitive, accurate, repeatable but also long, expensive, destructive and need an important quantity of solvent. Near-infrared spectroscopy, which is fast, non-destructive and does not need any sample preparation nor solvent, seems to be an interesting alternative to the determining of the quality of the seeds treatment.

The purpose of this thesis is to study the seeds treatment quality using near-infrared hyperspectral imaging. This enables the analysis of several seeds simultaneously, in comparison with the results obtained with a classic near-infrared (NIR) instrument and with a chromatographic instrument. Three criteria have been studied: the identification of the type of applied pesticide, the homogeneity between several seeds lots based on the average dosing of pesticides and the homogeneity in the treatment between seeds of a same lot.

The discrimination models in average dosing allow to classify the samples or the seeds based on the variety (wheat, barley, spelt) and the treated/untreated status with a sensitivity of 100 percent, no matter the analytic method. The discrimination of pesticides groups allow, in the best-case scenario, to differentiate two out of three groups with a sensitivity of 100 %.

The analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC), by classic near-infrared spectroscopy and by near-infrared hyperspectral imaging showed the heterogeneity of the seeds treatment, not only between the seeds lots but also between the seeds of a same lot. Indeed, 54% of the seeds lots treated with Kinto Duo's formula and 94% with Redigo one show average contents of active substances, which exceeds the 30% acceptable limit around the target dose. Seed-by-seed dose analysis have also showed variations between the seeds of a same lot, much higher than the 25% recommended. The models established from the infrared spectrum don't allow a quantitative analysis of the active substances contents. It is however possible to classify with some models the samples in under-dosage and over-dosage for the two near-infrared methods. The near-infrared hyperspectral imaging is also able to distinguish the treated/untreated zones within a seed.

The use of the near infrared spectroscopy opens new prospects for the control of seeds treatment quality.

# TABLE DES MATIERES

---

Remerciements .....	i
Résumé français .....	ii
Résumé anglais.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
I. Introduction et objectifs du travail .....	1
II. État de l'art.....	3
1. Présentation générale des pesticides .....	3
1.1. Définitions et historique.....	3
1.2. Classification des pesticides .....	5
1.3. Réglementation.....	7
2. Effets des pesticides sur l'environnement et la santé .....	9
2.1. Effets des pesticides sur l'environnement .....	9
2.2. Effets des pesticides sur la santé.....	10
3. Traitement des semences .....	13
3.1. Méthode d'application des traitements .....	14
3.2. Qualité du traitement .....	15
4. Méthodes analytiques pour l'analyse des pesticides de détection des pesticides.....	17
4.1. Méthodes classiques .....	17
4.2. Spectroscopie infrarouge .....	19
III. Matériels et méthodes.....	26
1. Description des échantillons analysés.....	26
2. Analyse par Chromatographie liquide à ultra performance .....	29
2.1. Réactifs.....	29
2.2. Appareillage .....	29
2.3. Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen .....	29
2.4. Mode opératoire pour l'analyse en dosage semence par semence .....	32
2.5. Calcul et expression des résultats .....	33
3. Analyse par spectroscopie proche infrarouge classique (Bruker MPA).....	34
3.1. Appareillage .....	34
3.2. Mode opératoire pour l'analyse des formulations et des matières actives .....	35
3.3. Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen .....	35

4.	Analyse par imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan) .....	36
4.1.	Appareillage .....	36
4.2.	Mode opératoire pour l'analyse des formulations .....	36
4.3.	Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen .....	37
4.4.	Mode opératoire pour l'analyse en dosage semence par semence .....	37
5.	Méthodologie et traitement des données .....	38
5.1.	Prétraitement des données spectrales .....	38
5.2.	Création de bibliothèques .....	39
5.3.	Calibration – Validation croisée – Validation .....	39
5.4.	Modèles de discrimination .....	40
5.5.	Équations d'étalonnage .....	40
IV.	Résultats et discussion .....	42
1.	Analyse par chromatographie liquide à ultra performance .....	42
1.1.	Validation de la méthode d'analyse .....	42
1.2.	Résultat .....	43
1.3.	Discussion .....	46
2.	Analyse par spectroscopie proche infrarouge .....	48
2.1.	Spectres des formulations, des matières actives et des semences traitées .....	48
2.1.1.	Résultats .....	48
2.1.2.	Discussion .....	50
2.2.	Traitement des analyses par spectroscopie proche infrarouge en dosage moyen .....	51
2.2.1.	Spectroscopie proche infrarouge classique (Bruker MPA) .....	51
2.2.2.	Imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan) .....	55
2.2.3.	Discussion .....	58
2.3.	Traitement des analyses par spectroscopie proche infrarouge en dosage semence par semence .....	60
2.3.1.	Résultats .....	60
2.3.2.	Discussion .....	63
V.	Conclusions et perspectives .....	65
VI.	Références bibliographiques .....	68
VII.	Annexes .....	81

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1 : Evolution de l'utilisation de différents produits phytopharmaceutiques (tonnes de substances actives) en agriculture entre 1992 et 2010.
- Figure 2 : Distribution de la consommation des différents types de pesticides en Belgique en 2005.
- Figure 3 : Répartition des Pesticides en deux classes : Les produits phytopharmaceutiques et les biocides.
- Figure 4 : Evolution de la population mondiale entre 1950 et 2014 avec les prédictions pour 2050.
- Figure 5 : Dispersion des pesticides dans l'air, le sol et l'eau.
- Figure 6 : Prototype pour détecter les résidus de pesticides à la surface des pommes par la spectroscopie de Raman.
- Figure 7 : Domaine du spectre électromagnétique.
- Figure 8 : Absorption d'une radiation électromagnétique (photon) ( $E_p$ ) résultant en une transition de l'état fondamental ( $E_1$ ) de la molécule à un état excité ( $E_2$ ).
- Figure 9 : Vibration d'une molécule diatomique selon le modèle de l'oscillateur harmonique et anharmonique avec  $\nu$  la fréquence de la bande fondamentale.
- Figure 10 : Différents modes de vibrations d'une molécule triatomique.
- Figure 11 : Transmission de la lumière à travers un échantillon.
- Figure 12 : Diffusion de la lumière par la matière.
- Figure 13 : Filtre tournant.
- Figure 14 : Filtre basculant.
- Figure 15 : Formule chimique du prochloraz.
- Figure 16 : Formule chimique du triticonazole.
- Figure 17 : Formule chimique du prothioconazole.
- Figure 18 : Instrument de chromatographie liquide à ultra performance.
- Figure 19 : Interféromètre de Michelson.
- Figure 20 : Instrument de spectrométrie proche infrarouge (Bruker Multi purpose analyser) avec un agrandissement sur la fenêtre d'analyse.
- Figure 21 : Cuvettes en verre contenant les formulations Kinto Duo, Redigo et Beret gold.
- Figure 22 : Analyse d'une formulation avec Bruker MPA.

- Figure 23 : Réducteur inerte contenant la matière active.
- Figure 24 : Analyse d'une matière active avec Bruker MPA.
- Figure 25 : Cellule contenant un échantillon de semences.
- Figure 26 : Analyse d'un échantillon de semences traitées avec Bruker MPA.
- Figure 27 : Principe de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge.
- Figure 28 : Caméra d'imagerie hyperspectrale en proche infrarouge : le Burgermetrics line scan.
- Figure 29 : Disposition des échantillons sur une plaque de céramique pour l'analyse par caméra hyperspectrale proche infrarouge des 3 formulations de pesticides : Kinto Duo, Redigo et Beret Gold.
- Figure 30 : Disposition des échantillons sur le tapis roulant pour l'analyse en dosage moyen par caméra hyperspectrale proche infrarouge des semences traitées.
- Figure 31 : Disposition des échantillons sur le tapis roulant pour l'analyse en dosage semence par semence par caméra hyperspectrale proche infrarouge des semences traitées.
- Figure 32 : Masque appliqué sur une ligne de 8 semences de blé.
- Figure 33 : Distribution du nombre d'échantillons traités au Kinto Duo pour chaque classe de teneurs en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 34 : Distribution du nombre d'échantillons traités au Redigo pour chaque classe de teneurs en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 35 : Distribution du nombre de semences d'épeautre traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneurs en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 36 : Distribution du nombre de semences de blé traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneurs en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 37 : Distribution du nombre de semences d'orge traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneurs en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 38 : Relation entre la teneur en matières actives du Kinto Duo et le poids de la semence.
- Figure 39 : Spectres proche infrarouge (PIR) acquis sur le Bruker MPA des formulations Kinto Duo, Redigo et Beret Gold pure et appliqués aux semences de blé et des matières actives prochloraz et prothioconazole.
- Figure 40 : Spectres proche infrarouge de la figure 40 prétraités avec une déviation normale standardisée (SNV) et une dérivée de type 5,2,1.
- Figure 41 : Spectres proche infrarouge acquis sur le Bruker des semences traitées et non traitées.
- Figure 42 : Spectres proche infrarouge acquis avec le Burgermetrics line scan d'une goutte de la formulation Kinto duo, Redigo et Beret Gold appliquée pure sur la céramique et sur des semences de blé ainsi que le spectre de semences de blé non traité.

- Figure 43 : Spectres proche infrarouge acquis sur la caméra d'imagerie hyperspectrale des semences traitées et non traitées.
- Figure 44 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres moyens des 85 échantillons acquis avec le Bruker MPA.
- Figure 45 : Analyse en composante principale réalisée sur les spectres moyens des échantillons de blé acquis avec le Bruker MPA.
- Figure 46 : Loadings de la composante principale 4 de la Figure 45.
- Figure 47 : Classification hiérarchique des équations de discrimination.
- Figure 48 : Relation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites par les équations le tableau 19.
- Figure 49 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres moyens des 85 échantillons acquis avec le Burgermetrics line scan.
- Figure 50 : Analyse en composante principale réalisée sur les spectres moyens des échantillons de blé acquis avec le Burgermetrics line scan.
- Figure 51 : Loadings de la composante principale 3 de la Figure 50.
- Figure 52 : Relation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites par les équations le tableau 22.
- Figure 53 : Discrimination des zones traitées et non traitées sur une semence de blé.
- Figure 54 : Discrimination des zones traitées et non traitées sur une semence d'orge.
- Figure 55 : Discrimination des zones traitées et non traitées sur une semence d'épeautre.
- Figure 56 : Relation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites par l'équation du tableau 24 pour les semences de blé.
- Figure 57 : Relation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites par l'équation du tableau 24 pour les semences d'orge.
- Figure 58 : Relation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites par l'équation du tableau 24 pour les semences d'épeautres.
- Figure 59 : Distribution du nombre de semences de blé traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneur en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 60 : Distribution du nombre de semences de blé traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneur en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 61 : Distribution du nombre de semences d'orge traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneur en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.
- Figure 62 : Distribution du nombre de semences d'orge traitées au Kinto Duo pour chaque classe de teneur en matières actives par tranche de 10 % autour de la dose cible.

## LISTE DES TABLEAUX

---

- Tableau 1 : Classification des pesticides selon l'organisme ciblé.
- Tableau 2 : Principales familles chimiques de pesticides.
- Tableau 3 : Principaux processus auxquels sont soumis les pesticides dans le sol.
- Tableau 4 : Substances actives autorisées en Belgique.
- Tableau 5 : Comparaison des caractéristiques et avantages des différentes techniques de traitement des semences.
- Tableau 6 : Description des pesticides utilisés dans l'étude.
- Tableau 7 : Nombre d'échantillons par classe.
- Tableau 8 : Composition en matières actives des formulations Kinto Duo et Redigo.
- Tableau 9 : Tableau de dilution des solutions de référence.
- Tableau 10 : Gradient de solvants utilisé lors des analyses UPLC.
- Tableau 11 : Pressions mesurées en début d'analyse UPLC.
- Tableau 12 : Pressions mesurées en début d'analyse UPLC.
- Tableau 13 : Matrice de confusion.
- Tableau 14 : Répétabilité de six injections successives de solutions de référence de prochloraz, de triticonazole et de prothioconazole.
- Tableau 15 : Concentration en matières actives des solutions de référence.
- Tableau 16 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance.
- Tableau 17A : Teneurs moyennes en matières actives par espèce de semences mesurées par chromatographie liquide ultra à performance.
- Tableau 17B : Teneurs moyennes en matières actives par espèce de semences mesurées par chromatographie liquide ultra à performance.
- Tableau 18 : Performance des modèles de discrimination conçu à partir des spectres acquis avec le Bruker MPA.
- Tableau 19 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives pour l'orge établie à partir des spectres moyens et des 3 spectres acquis par le Bruker MPA.
- Tableau 20 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Bruker MPA.

Tableau 21 : Performance des modèles de discrimination conçu à partir des spectres acquis avec le Burgermetrics line scan.

Tableau 22 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives pour l'orge établie à partir des spectres moyens et des 8 spectres acquis par le Burgermetrics line scan.

Tableau 23 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Burgermetrics line scan.

Tableau 24 : Pourcentage de semences bien classées, prédites par le modèle de calibration.

Tableau 25 : Equation d'étalonnage de la teneur en matières actives par semence établie à partir des spectres acquis avec la caméra Burgermetrics line scan.

Tableau 26 : Teneurs moyennes en matières actives par semences mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Bruker MPA.

# I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

---

Le traitement des semences avec des produits de protection des plantes assure une protection de la semence de la germination jusqu'au premier stade de végétation. La dose reçue par chaque graine est calculée de façon à être optimale et disponible en continu. C'est pourquoi, pour que le traitement des semences atteigne son objectif, il est impératif que la matière active soit appliquée au taux cible et uniformément entre les semences d'un même lot. Les contrôles effectués sur les semences disponibles dans le commerce sont peu fréquents. Pourtant, un sous-dosage peut entraîner une protection insuffisante des semences. Inversement, un surdosage peut accroître le risque de phytotoxicité pour la semence et constituer une perte économique pour le producteur de semences traitées.

Les méthodes de référence couramment utilisées pour évaluer la qualité du traitement des semences sont les méthodes chromatographiques. Bien que sélectives, sensibles, précises et répétables, ces méthodes sont longues, coûteuses et destructives. De plus, elles nécessitent une préparation parfois complexe des échantillons et une quantité importante de solvant. Ces méthodes de référence sont limitées à la détection de quelques échantillons et restreintes à l'analyse en laboratoire. D'où l'intérêt de développer des techniques d'analyse rapides, non destructives, ne nécessitant pas de préparation d'échantillons. La spectroscopie proche infrarouge, répondant à ces critères, est une alternative pouvant être utilisée dans le cadre du contrôle en ligne en industrie.

En 2003, Olivier Pigeon, dans le cadre de sa thèse, mesurait la teneur moyenne en matières actives présente dans un échantillon et entre les semences d'un lot à l'aide d'un spectromètre proche infrarouge. Ces résultats étaient encourageants, mais l'appareil utilisé ne lui permettait d'analyser qu'un seul échantillon ou une seule semence à la fois.

Ce travail a pour but d'évaluer la qualité du traitement des semences au moyen d'un système analytique basé sur l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge, permettant d'analyser simultanément plusieurs semences, en comparaison avec les résultats obtenus sur un instrument de spectrométrie proche infrarouge (SPIR) classique et sur un instrument de chromatographie. Afin d'évaluer cette qualité, des analyses en dosage moyen par échantillon et en semence par semence ont été réalisées.

Les analyses en dosage moyen ont un triple objectif. Le premier consiste à établir des modèles de discrimination entre les différentes formulations de pesticides. Le second est d'analyser la variabilité de teneur en matières actives entre les lots de semences. Le troisième objectif est de comparer les résultats obtenus entre un instrument SPIR classique (Bruker MPA) et une caméra d'imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan).

Pour des raisons pratiques, les analyses en semence par semence ne sont réalisées que sur la caméra d'imagerie hyperspectrale. Le premier objectif spécifique est d'évaluer l'homogénéité de traitement au sein d'une semence en identifiant les zones non traitées. Le second est d'évaluer l'homogénéité de traitement entre les semences en déterminant la distribution des teneurs en matières actives sur les semences d'un même lot.

La première partie du travail présente quelques généralités sur les pesticides avec leur réglementation et leur classification, leur impact sur la santé et l'environnement, une description

des techniques de traitement des semences et différentes méthodes analytiques permettant la détection des pesticides.

La seconde partie décrit les échantillons, l'appareillage et les modes opératoires utilisés pour les trois instruments : la chromatographie liquide à ultra performance (Waters Acquity), le spectromètre proche infrarouge (Bruker MPA) et la caméra d'imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan).

La troisième partie présente les résultats d'analyses et les discussions associées pour la caractérisation spectrale des formulations de pesticides, de leurs matières actives et des semences traitées, pour les dosages moyens et pour les dosages semence par semence sur divers lots de céréales traitées

La dernière partie apporte une conclusion générale et quelques perspectives d'avenir pour le contrôle qualité du traitement pesticide sur les semences.

## II. ÉTAT DE L'ART

---

### 1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES PESTICIDES

#### 1.1. Définitions et historique

##### 1.1.1. Définitions

Le mot pesticide est d'origine anglaise. Il est issu de l'association du mot anglais *pest* (animal ou insecte nuisible) provenant du latin *pestis* (fléau, calamité) et du suffixe *-cide* découlant lui aussi du latin *-cida* (verbe *caedo, caedere*, signifiant tuer). Il a d'abord été traduit en anglais en 1940 avant d'être intégré à la langue française en 1950 (Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), 2013).

*Le Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides* de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2002) définit les pesticides comme étant « une substance ou une association de substances destinée à lutter contre les nuisibles. Elle a pour but de protéger les denrées alimentaires, les produits agricoles, le bois et des produits ligneux ainsi que les aliments destinés aux animaux contre les ravageurs et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux susceptibles de causer des dommages. Cette protection peut intervenir durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation de ces produits. Le terme pesticide reprend les substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des plantes, défoliants, agent de dessiccation, agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits. Il comprend aussi les substances appliquées sur les cultures, soit avant, soit après la récolte, en vue de protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport ».

Plus simplement, les pesticides désignent « les substances actives, les préparations ou les produits utilisés pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries » (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, 2012). Les substances actives déterminent l'action du pesticide et sont définies par la Directive 91/414/CEE (European Commission, 1991) comme étant « des substances ou micro-organismes, y compris les virus, exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux ».

Les pesticides peuvent être utilisés pour assurer la protection des semences et des plantules. Le traitement des semences est défini par Commeau *et al.* (1996) comme une « opération consistant à appliquer ou mettre en œuvre un ou plusieurs agents physiques, chimiques ou biologiques sur la semence afin d'en assurer la protection depuis la germination jusqu'à des stades végétatifs plus ou moins avancés selon les espèces et les produits ». Il permet de lutter contre les maladies transmises par la semence elle-même, mais aussi de la protéger contre certains champignons et prédateurs (Commeau *et al.*, 1996).

Après l'application du pesticide et en fonction du climat, du délai entre l'application et la récolte, des pratiques agricoles, notamment le nombre de traitements et la dose utilisée, il peut rester des résidus de pesticides sur les produits récoltés. Ceux-ci peuvent entraîner des risques pour l'utilisateur, le consommateur ainsi que pour l'environnement. Ces résidus sont définis par Le Codex Alimentarius (1994) comme « toute substance déterminée présente dans les aliments, les produits

agricoles ou les aliments pour animaux par suite de l'utilisation d'un pesticide. Ce terme englobe tous les dérivés d'un pesticide, tels que les produits de conversion et de réaction, les métabolites et les impuretés que l'on considère comme ayant une importance sur le plan toxicologique ».

### 1.1.2. Historique

On trouve les premières traces d'utilisation de la lutte chimique en 1000 avant J.C. en Grèce Antique avec l'utilisation du soufre en agriculture. Peu après, en 60 avant J.C., le naturaliste romain Pline l'Ancien préconisait de tremper les semences de céréales dans du vin ou dans de l'extrait de feuilles de cyprès pour les désinfecter. En 19 avant J.C. Virgile recommandait d'enrober les semences avec de l'extrait d'olive ou de la soude pour limiter les dégâts de charançon (Semal, 1982; Tissu *et al.*, 1979).

Dès l'antiquité, on commence à utiliser les plantes pour leurs propriétés toxiques. Leur utilisation va rapidement s'étendre suite à la rédaction en 1135 du « traité des poisons » par Moïse Maïmonide. C'est le cas par exemple de l'emploi de l'aconit, herbe vivace des montagnes, contre les rongeurs ou encore de la roténone, substance extraite de certaines légumineuses, et de la nicotine, extraite du tabac, comme insecticide (Larousse, 2015; Encyclopédie de l'Agora, 2006).

Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'essor de l'industrie et de la chimie minérale va permettre le développement des pesticides grâce à l'apport de nouveaux composés chimiques, tels que le sulfate de cuivre, qui mélangé à la chaux donnera la bouillie bordelaise connue pour protéger les vignes et les pommes de terre du mildiou, une maladie fongique.

Ce n'est qu'après la Première Guerre mondiale qu'on assistera véritablement à l'essor des pesticides. Cet essor est dû entre autres, à la nécessité d'un redressement économique suite aux ravages de la guerre. Mais aussi à l'évolution de l'exploitation agricole en Europe, caractérisée par une diminution de la main-d'œuvre disponible et un rejet des techniques pénibles. Cette évolution couplée au développement de l'industrie chimique et à la législation encore peu astreignante qui ont entraîné l'envol des pesticides (Tissut *et al.*, 1979).

La Deuxième Guerre mondiale sera marquée par l'utilisation massive du Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane, plus connu sous l'abréviation DDT. Grâce à ses capacités de lutte contre les ravageurs des cultures et les insectes vecteurs, il permettra d'arrêter une épidémie de Typhus en Italie et de lutter contre le paludisme en Indonésie. Le DDT figurera en tête de liste des pesticides organophosphorés utilisés jusqu'à être interdit dans les années 70 en Belgique (Fillatre, 2011; Santé public fédéral, Sécurité de la chaîne alimentaire et environnement, 2015).

En 1980, les progrès dans le domaine de la biochimie conduiront à l'introduction de nouveaux pesticides résultant d'une recherche birationnelle. C'est-à-dire qu'on est désormais capable de relier l'activité d'une molécule avec sa formule chimique. En plus de leur meilleure efficacité et des doses encore réduites, ces pesticides sont plus sélectifs limitant ainsi les risques pour l'environnement et les organismes non ciblés. Leur utilisation deviendra incontournable en agriculture. C'est ainsi qu'on verra leur emploi doubler tous les 10 ans entre 1945 et 1985 (ANSES, s.d.; Fillatre, 2011).

L'usage des pesticides a permis de maximiser les rendements agricoles, freinant ainsi la déforestation et limitant la main-d'œuvre, mais aussi d'améliorer la qualité des produits, préservant ainsi la santé publique. Cependant, les effets indésirables vont rapidement apparaître. On voit notamment émerger des résistances chez les organismes cibles. C'est pourquoi, suite à la prise de conscience quant aux méfaits des pesticides sur l'environnement et la santé, au retrait de

produits jugés trop dangereux ainsi qu'à leur efficacité croissante, la consommation de pesticides en Europe a progressivement diminué (Encyclopédie de l'Agora , 2006) (**Figure 1**).

Le traitement des semences connaîtra quant à lui son essor au cours du 20<sup>ème</sup> siècle. De 1914 à 1976 les semences étaient principalement traitées avec des fongicides organo-mercuriques pour lutter contre la fonte des semis. Cependant la mauvaise adhésion de ces composés sur les semences entraîna des problèmes de phytotoxicité. La fin du 20<sup>ème</sup> siècle fut marquée par l'introduction de molécules efficaces pour le traitement des semences. Notamment des fongicides efficaces à faible dose tels que le fluodioxonil, le difénoconazole, le tébuconazole et le triticonazole ainsi que des composés insecticides à large spectre comme l'imidaclopride, le fipronil et le thiamethoxam (Brandl, 2001). L'apparition de ces molécules offre aux agriculteurs un réel avantage économique. Des firmes phytopharmaceutiques vont fournir des produits permettant de réduire les doses par hectare et donc de limiter les problèmes sur l'environnement.

## 1.2. Classification des pesticides

Aujourd'hui plus de 300 matières actives homologuées entrent dans la composition des pesticides commercialisés pour l'agriculture (ANSES, s.d.). Ces produits chimiques peuvent différer notamment par leur mode d'action, leur fixation dans l'organisme, leur excrétion et leur toxicité rendant leur classification complexe (World Health Organization, United Nations Environment Programme, 1991). Il existe plusieurs façons de classer les pesticides : la classification biologique, chimique ou en fonction de l'usage.

### 1.2.1. Classification biologique

Le système de classification le plus couramment utilisé est celui qui tient compte de l'organisme cible. Comme illustré dans la **Figure 2**, en Belgique le groupe principal est celui des herbicides (57 % des pesticides), il lutte contre les mauvaises herbes et les plantes adventives. On trouve ensuite les fongicides (25 %) et les insecticides (10 %) avec pour cible respectivement les champignons et les insectes. Les classes biologiques sont citées dans le **Tableau 1** avec leurs organismes cibles (Eurostat, 2005).

**Tableau 1 : Classification des pesticides selon l'organisme ciblé (Uneke, 2007).**

<b>Pesticides</b>	<b>Cibles</b>
Acaricides	Acariens
Algicides	Algues
Avicides	Oiseaux
Bactéricides	Bactéries
Défoliants	Feuilles
Dessiccateurs	Plantes
Fongicides	Champignons
Herbicides	Mauvaises herbes
Insecticides	Insectes
Molluscicides	Mollusques
Nématocides	Nématodes
Piscicides	Poissons
Préservateurs du bois	Nuisibles du bois
Régulateurs de croissance	Plantes
Rodenticides	Rongeurs

### 1.2.2. Classification chimique

Les pesticides peuvent être regroupés en fonction de la propriété chimique de la substance active principale (**Tableau 2**), c'est-à-dire les atomes la constituant et leur structure. On distinguera donc les pesticides organiques, inorganiques et organométalliques.

Les pesticides organiques sont les plus nombreux et les plus utilisés. Ils appartiennent à diverses classes chimiques qui, selon le Pesticide Manual (Tomlin, 2000), correspondent à l'ensemble des molécules dérivées du noyau qui constitue une structure de base. Il est cependant important de souligner qu'il n'existe pas de relation claire entre la classe chimique et les propriétés d'un pesticide. Ce lien ne peut être fait qu'en prenant l'ensemble de la composition et de la structure de la molécule et non pas d'un seul de ses constituants. On trouve aujourd'hui plus de 80 classes de pesticides dont les principaux sont repris dans le **Tableau 2**. Il est à souligner que leur appellation est parfois arbitraire et varie d'un ouvrage à l'autre (Calvet *et al.*, 2005; Fillatre, 2011; INSERM, 2013; Sayen et Guillon, 2010).

Les pesticides inorganiques sont peu nombreux, mais utilisés en grande quantité. Ils ont été parmi les premiers pesticides utilisés, mais ne se dégradant pas, ils constituent un danger conséquent pour la santé et l'environnement (Boland *et al.*, 2004). À l'heure actuelle, leur utilisation est en nette diminution. Cette famille est principalement représentée par un herbicide (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et de cuivre tel que la bouillie bordelaise (Calvet *et al.*, 2005)

Les pesticides organométalliques sont constitués de cations métalliques (i.e. le zinc ou le manganèse) complexés avec des anions organiques dithiocarbamates (Calvet *et al.*, 2005). Dans cette famille on retrouve notamment les fongicides manèbe (manganèse) et zinèbe (zinc) (Sayen *et al.*, 2010).

### 1.2.3. Classification selon l'usage

Dans cette classification les pesticides sont groupés en fonction du domaine d'activité auquel ils sont destinés : les cultures, les bâtiments d'élevage, les bâtiments de stockage, les bâtiments d'habitation, les zones non agricoles et les personnes et animaux (Calvet *et al.*, 2005).

### 1.3. Réglementation

En Europe, la Commission européenne distingue deux catégories de pesticides. D'une part les produits phytopharmaceutiques, aussi appelés produits de protection des plantes qui concernent la protection des végétaux ou des produits végétaux (**Figure 3**). Et d'autre part, les biocides qui selon la Directive 98/8/CE (European Commission, 1998) sont destinés à « lutter contre les organismes nuisibles pour la santé humaine ou animale et les organismes qui endommagent les produits naturels ou manufacturés ».

#### 1.3.1. Produits phytopharmaceutiques

Le 21 octobre 2009, le Parlement européen et le Conseil adoptent le « paquet pesticides ». Ce nouveau règlement regroupe deux règlements et deux directives (Service public de Wallonie, s.d.) : les règlements (CE) n°1107/2009 et n°1185/2009 et les directives 2009/128/CE et 2009/127/CE.

Le règlement européen n°1107/2009 (European Commission, 2009) est entré en vigueur le 14 juin 2011. Il concerne la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et remplace les directives 79/117/CEE (European Commission, 1978) et 91/414/CEE (European Commission, 1991).

L'article 2 du règlement n°1107/2009 (European Commission, 2009) définit les produits phytopharmaceutiques comme étant « les produits, composés de substances actives, phytoprotecteurs<sup>1</sup> ou synergistes<sup>2</sup>, ou en contenant, et destinés à l'un des usages suivants:

- Protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou prévenir l'action de ceux-ci, sauf si ces produits sont censés être utilisés principalement pour des raisons d'hygiène plutôt que pour la protection des végétaux ou des produits végétaux;
- Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, telles les substances, autres que les substances nutritives, exerçant une action sur leur croissance;
- Assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions communautaires particulières concernant les agents conservateurs;
- Détruire les végétaux ou les parties de végétaux indésirables, à l'exception des algues à moins que les produits ne soient appliqués sur le sol ou l'eau pour protéger les végétaux;
- Freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux, à l'exception des algues à moins que les produits ne soient appliqués sur le sol ou l'eau pour protéger les végétaux. »

Ce règlement vise essentiellement à accroître le degré de protection de la santé humaine, des animaux et de l'environnement, et ce sans nuire à la compétitivité de l'agriculture. De plus, il permet d'adapter et de simplifier les procédures et les examens de dossier dans l'Union européenne mais aussi de faciliter la circulation et la disponibilité des produits dans les Etats membres (ANSES, s.d.).

<sup>1</sup> « Substances ou préparations qui sont ajoutées à un produit phytopharmaceutique pour annihiler ou réduire les effets phytotoxiques du produit phytopharmaceutique sur certaines plantes » (European Commission, 2009).

<sup>2</sup> « Substances ou préparations qui peuvent renforcer l'activité de la ou des substances actives présentes dans un produit phytopharmaceutique » (European Commission, 2009).

Le règlement n°1185/2009 (European Commission, 2009) relatif aux statistiques sur les pesticides concerne les quantités de pesticides misent sur le marché chaque année. Il vise à évaluer les politiques de l'Union européenne sur le développement durable et à concevoir des indicateurs de risques pour la santé et l'environnement dus à l'utilisation de pesticides (Dayde, 2011).

La directive 2009/128/CE (European Commission, 2009) instaure un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable. Elle a pour but de limiter les risques pour la santé et l'environnement tout en assurant une protection suffisante des cultures (Comité régional phyto, s.d.).

Cette directive prévoit pour chaque état membre des systèmes de formation et de certification pour les distributeurs, les conseillers et les utilisateurs professionnels de pesticides, le contrôle régulier du matériel de pulvérisation des professionnels, l'interdiction de la pulvérisation aérienne (sauf en cas de dérogation), l'utilisation restreinte ou interdite des pesticides dans certaines zones telles que les lieux publics, les milieux aquatiques et les alimentations en eau potable et des systèmes de lutte intégrée contre les ennemis des cultures (ANSES, s.d.).

Enfin la directive 2009/127/CE (European Commission, 2009) concerne les machines destinées à l'application des pesticides. Ces machines devront répondre à certaines exigences afin de protéger l'environnement. Elles seront dès lors construites de manière à prévenir les fuites et les pertes de fluides à l'arrêt, mais aussi de manière à permettre une vidange et un nettoyage facile, un remplissage précis afin de ne pas contaminer l'environnement (Dayde, 2011).

### **1.3.2. Biocides**

La directive 98/8/CE a été abrogée en 2013 par le règlement n°528/2012 (European Commission, 2012) concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. Elle limite la mise sur le marché aux produits efficaces et présentant des risques minimales pour l'homme, les animaux et l'environnement.

Cette mesure nécessite une évaluation communautaire de la substance active du produit et une évaluation nationale du produit (ANSES, s.d.).

## 2. EFFETS DES PESTICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTÉ

### 2.1. Effets des pesticides sur l'environnement

Les pesticides sont un intrant important en agriculture puisqu'ils permettent d'augmenter la productivité. En effet, la révolution verte, en combinant la sélection de variétés à haut rendement et l'utilisation d'engrais, de produits sanitaires et de l'irrigation, a permis de doubler la production de nourriture depuis les années 60. Durant cette période, la population mondiale a également doublé (Popp *et al.*, 2013). La FAO (2009) prévoit pour 2050 encore une augmentation de la population de 34 % par rapport à 2009 (**Figure 4**) (Dhakal *et al.*, 2014). Pour répondre à cette augmentation démographique, la production agricole doit continuer à croître, et ce aussi bien pour l'alimentation que pour les bioénergies. Il faudra, par exemple, passer de 2,1 milliards de tonnes de céréales à 3 milliards en 2050 (FAO, 2009).

Une façon de répondre à ce problème est d'accroître la production en réduisant les pertes pré-récolte dues en majeure partie aux nuisibles. D'après l'étude d'Oerke (2005), ces pertes représentent environ 30 % du rendement potentiel des cultures sans l'utilisation des pesticides, contre seulement 10 % avec leur application (Pimentel *et al.*, 1993).

L'utilisation des produits phytosanitaires peut être néfaste pour l'environnement. Ceci dépend de leur toxicité, de leur mobilité et de la persistance du produit ainsi que des conditions météorologiques et la proximité avec un cours d'eau ou les conditions (OECD, 2008).

Environ 4,6 millions de tonnes de pesticides sont utilisées chaque année dans le monde (Zhang *et al.*, 2011). Toutefois, la proportion qui atteint l'organisme cible est minime : Pimentel (1995) estime cette portion à seulement 0,3 %. Par conséquent 99,7% des pesticides utilisés n'atteignent pas leur cible et se retrouvent dans l'environnement.

Deux facteurs sont pris en compte pour déterminer l'impact environnemental du produit sur l'environnement : les caractéristiques toxicologiques du pesticide et le degré d'exposition qui dépend de la dispersion et de la concentration du produit dans l'environnement (Severn et Ballard, 1990; Emans *et al.*, 1992).

Les pesticides sont plus ou moins dispersés en fonction de la méthode d'application. En général, ils sont pulvérisés sous forme liquide par tracteur à l'aide de rampes de pulvérisation (**Figure 5**) (De Luca *et al.*, 2007). Ils peuvent également être pulvérisés par avion. Ces deux méthodes de vaporisation engendrent la présence de pesticides dans l'air qui peuvent dériver et contaminer l'environnement. Selon Pimentel et Levitan (1986) jusqu'à 50 % du produit peut être perdu dans l'air avant même d'atteindre la culture par voie aérienne contre 30 % pour les rampes. Il est également possible d'incorporer les produits phytosanitaires au sol sous forme de granulés ou en enrobant les graines ce qui permet de réduire les pertes aériennes (Van der Werf, 1997).

D'autres mécanismes peuvent entraîner la présence de ces produits dans l'air : L'érosion éolienne et la volatilisation (**Figure 5**). Dans le cas de l'érosion éolienne, des particules de sol et des poussières contaminées sont entraînées par le vent alors que lors de la volatilisation le transfert dans l'air se fait sous forme gazeuse de la plante vers l'air (ANSES, s.d.; Van der Werf, 1997). Une fois dans l'air les polluants peuvent y demeurer et s'accumuler, être transformés en réagissant avec la vapeur d'eau, être oxydés ou dégradés par des processus photochimiques. Ils peuvent également être transportés sur de longues distances avant de retourner sur l'écosphère sous forme de dépôts secs par gravitation des particules solides ou sous forme de dépôts humides emportés lors des précipitations ou par le brouillard.

Une fois au sol, les pesticides vont être soumis à différents processus qui détermineront la disponibilité des produits phytosanitaires dans le sol. Ces phénomènes concernent aussi bien la transformation que la rétention et le transport de ces produits. Ce sont eux qui vont permettre d'estimer la fraction du produit disponible dans le sol. Cette fraction pourra exercer son action de protection de la plante, être dégradée par les microorganismes du sol ou encore être emportée et contaminer les nappes phréatiques et les aquifères profondes (Barriuso, 2003).

Le **Tableau 3** suivant reprend les principaux processus auxquels sont soumis les pesticides dans le sol déterminant leur disponibilité (Barriuso, 2003).

Le devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement dépend de différentes caractéristiques :

- La solubilité dans l'eau : permet d'avoir une indication sur la quantité de substance qui sera présente dans le compartiment aqueux.
- La pression de vapeur : détermine si le produit est plutôt sous forme gazeuse et donc pourra passer dans l'air et être transportée sur de longues distances avant de retourner au sol ou si elle est plutôt sous forme particulaire et donc ne passera que très peu dans l'atmosphère.
- Le coefficient de répartition octanol/eau : classe la substance en fonction de son caractère lipophile afin de détecter les substances lipophiles ayant un potentiel de bioaccumulation.
- La constante de dissociation : indique la force de l'acide qui influence les réactions d'hydrolyse et de rétention dans le sol.
- La demi-vie de la substance : renseigne sur le temps nécessaire pour dégrader la moitié de la quantité de la substance.

La contamination des différents compartiments (air, sol, eau) peut avoir des conséquences toxiques aussi bien pour l'environnement que pour l'homme.

## 2.2. Effets des pesticides sur la santé

L'utilisation accrue des pesticides a permis de réduire fortement les famines dans les pays industrialisés à forte croissance démographique. Cependant, l'emploi de ces produits constitue un risque pour la santé humaine (Tissut *et al.*, 1979).

### Définition du résidu

L'utilisation des pesticides ne contamine pas uniquement l'eau, le sol et la terre, ils peuvent également s'accumuler dans les cultures. C'est pourquoi il existe des outils permettant de mesurer le niveau de résidu de pesticides présent dans les aliments (Bakirci *et al.*, 2014).

La commission du Codex alimentarius (1994) définit les résidus de pesticides comme « toute substance déterminée présente dans les aliments, les denrées agricoles ou les produits pour l'alimentation animale à la suite de l'utilisation d'un pesticide. Ce terme englobe tous les dérivés d'un pesticide, tels que les produits de conversion et de réaction, les métabolites et les impuretés que l'on considère comme ayant une importance sur le plan toxicologique. Les résidus de pesticides comprennent les résidus provenant de sources inconnues ou inévitables (par exemple de l'environnement), tout comme d'utilisation connue d'un produit chimique ».

Afin de protéger la santé du consommateur, les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires sont contrôlés de façon à s'assurer qu'ils ne dépassent pas les limites maximales de résidus (LMR).

Les limites maximales de résidus représentent la concentration maximale de pesticides qu'une matrice alimentaire peut contenir. Elles sont fixées par la Commission européenne de façon à ne pas dépasser les teneurs en résidus de pesticides résultant d'une utilisation adéquate des produits phytosanitaires selon les bonnes pratiques agricoles (BPA). Elles dépendent également des propriétés de la substance active et de l'impact des résidus sur les cultures traitées. Ces limites permettent à la fois de préserver la santé du consommateur et de faciliter le commerce international (Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), 2015; Commission européenne, 2008; OMS, 1997).

La limite maximale de résidus est, par exemple de 0,5 mg/kg pour le prochloraz appliqué sur les semences comme fongicide (European commission, 2015; Service public fédéral et Sécurité de la chaîne alimentaire et environnement, s.d.).

### **Voies d'expositions aux pesticides**

Les pesticides sont présents partout dans l'environnement, aussi bien dans l'air, sur les surfaces, dans l'eau que dans les denrées alimentaires. On peut tout d'abord distinguer deux catégories d'exposition : les expositions directes et indirectes (Bakirci , 2014; INSERM, 2013).

Les expositions directes concernent les personnes en contact direct avec les pesticides (Graillot, 2012). Ce type d'exposition concerne les professionnels, dont les agriculteurs, qui préparent et appliquent les produits ou nettoient les appareils de traitement. Ces expositions sont très variables en fonction des saisons, des cultures et des exploitations, il est donc difficile de les mesurer ou d'en analyser les effets. Des équipements, tels que des gants et des combinaisons, existent pour se protéger de l'exposition aux pesticides. Cependant, Baldi *et al.* (2006) ont démontré dans leur étude que le port d'une combinaison ne permettait pas totalement de protéger les opérateurs des pesticides. L'exposition directe aux pesticides concerne également les particuliers lors de l'usage domestique des pesticides (Merhi, 2008). Les produits utilisés dans ce cadre sont trop souvent appliqués et rangés sans précaution particulière et à proximité de l'habitation pouvant dès lors contaminer l'eau, l'air, mais surtout entraîner l'exposition accidentelle des enfants (Alterre Bourgogne, 2009; Batsch, 2011; Grange *et al.*, 2008).

Les expositions indirectes sont principalement provoquées par l'exposition aux résidus de pesticides dans les aliments ou l'environnement. Elles concernent donc l'ensemble de la population (Batsch, 2011; Bouvier, 2006). Il est possible d'estimer la quantité de pesticides ingérée en mesurant la quantité présente dans l'eau et les aliments constituant notre alimentation. Les femmes enceintes, leur bébé ainsi que les enfants en bas âges sont des personnes à risques qu'il est donc important de tenir à distance d'une exposition (ANSES, s.d.).

Les contaminations aux pesticides, que ce soit via une exposition directe ou indirecte, peuvent survenir selon trois voies d'exposition : La voie cutanée, respiratoire ou digestive (Tissut *et al.*, 1979).

### Conséquence des pesticides sur la santé

La présence de résidus de pesticides peut engendrer différents risques en fonction de la durée et de l'intensité de l'exposition. On y distingue les intoxications aiguës et chroniques.

La toxicité aiguë résulte d'une exposition de courte durée à une grande concentration de pesticides (Tissut *et al.*, 1979). Les effets résultant d'intoxications aiguës sont bien documentés grâce aux cas répertoriés par les centres antipoison et les cas observés dans le milieu professionnel. Néanmoins s'il est facile de connaître le type d'effet qu'entraînera un certain pesticide, il est beaucoup plus difficile de connaître l'effet cumulé d'une exposition à plusieurs pesticides (Gatignol et Étienne, 2010).

Les intoxications chroniques surviennent suite à une exposition prolongée à de faibles doses de produits phytosanitaires. Elles apparaissent généralement dans le milieu professionnel et sont souvent irréversibles. Contrairement aux effets aigus, les effets à long terme sont plus difficilement identifiables en raison du nombre parfois important de produits à considérer et par conséquent de leurs interactions (Grange *et al.*, 2008).

### 3. TRAITEMENT DES SEMENCES

Le traitement des semences est défini par Commeau et Spire (1996) comme une « opération consistant à appliquer ou mettre en œuvre un ou plusieurs agents physiques, chimiques ou biologiques sur la semence afin d'en assurer la protection depuis la germination jusqu'à des stades végétatifs plus ou moins avancés selon les espèces et les produits.

En 1755, l'abbé Tillet démontre qu'en lavant les semences de blé à l'eau de cendre, il pouvait lutter contre la carie du blé. C'est à ce moment que le concept de protection des semences est né (Beulin *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, en plus de la désinfection de la graine, le traitement des semences est utilisé pour protéger la semence contre les ravageurs et contaminations du sol, mais également au début du stade de végétation en jouant un rôle de protection contre les champignons et les insectes (Pigeon, 2003; Rensing et Sztor, 1992). Le traitement des semences peut également promouvoir la croissance et le développement de la plante en incorporant notamment des éléments nutritifs, des molécules bioactives ou des substances favorisant la germination (Brandl, 2001; Pigeon, 2003).

Le traitement des semences présente de nombreux avantages comparé à d'autres techniques d'application de produits de protection des plantes telles que la pulvérisation. En effet, cette méthode dispose d'une action ciblée limitant ainsi le risque de contamination de l'écosystème. Elle constitue également un avantage pour l'agriculteur puisqu'elle permet d'augmenter la qualité et le rendement de la culture. De plus, la dose reçue par chaque graine est calculée de façon à être optimale et disponible en continu. Enfin, ce traitement préventif permet de limiter l'utilisation d'autres traitements en début de culture. Ces caractéristiques font du traitement des semences une méthode de traitement plus économique et moins néfaste pour l'environnement. (Beulin *et al.*, 2005; CropLife foundation, 2013).

Le **Tableau 4** reprend les différentes substances actives autorisées sur les semences en Belgique ainsi que leur domaine d'application (Service public fédéral, s.d.).

L'application d'insecticides permet de limiter les dommages induits par les insectes durant le stockage ou dans le sol. Les principaux insecticides utilisés sont les néonicotinoïdes. Ils agissent au niveau du système nerveux des insectes tout en ayant une toxicité faible chez les mammifères. De plus, ils sont rapidement absorbés par les semences et permettent de protéger la semence et la plantule pendant 40 jours après leur semis. Les insecticides néonicotinoïdes autorisés en Belgique pour le traitement des semences sont le chlothianidine, l'imidacloprid et le thiamethoxam (Hladik *et al.*, 2014).

Les fongicides sont appliqués sur les semences pour les protéger des champignons et autres organismes pathogènes présents dans la graine et dans le sol (Pigeon, 2003; Tekrony, 2005). Certaines bactéries ou champignons peuvent également être utilisés pour contrôler le développement d'autres organismes pathogènes ou pour favoriser le développement de la plante. Cependant ce type d'application reste souvent limité au laboratoire, les conditions en champs pouvant fortement varier (Pigeon, 2003).

Afin de faciliter la germination des semences ou de favoriser la croissance des plantes, des hormones végétales ou des éléments nutritifs tels que le zinc et le cuivre peuvent être appliqués sur les semences. C'est ce qu'on appelle des éléments fonctionnels (Brandl, 2001).

### 3.1. Méthode d'application des traitements

La formulation du traitement doit être réalisée de manière à assurer une bonne adhésion des substances actives sur la graine et leur pénétration dans ses tissus. De plus, la matière active doit être répartie de façon homogène entre les semences d'un lot et uniformément sur chacune des semences. C'est pourquoi il existe des appareils qui enrobent les semences d'une matière inerte permettant de bien fixer les substances actives. Un colorant est également ajouté afin de reconnaître les semences traitées. Il est également possible d'incorporer une substance amère pour éviter que les animaux ne les mangent (Maciejewski, 2013; Matthews, 1966).

Divers types de formulation sont utilisés pour recouvrir les semences, chacun associé à un code (Australian pesticides and veterinary medicines authority (APVMA), 2014; FAO, 1995) :

- Formulation solide :
  - Poudre pour traiter les semences à sec : DS
- Formulation humide :
  - Solution pour traiter les semences : LS
  - Emulsion pour traiter les semences : ES
  - Suspension concentrée pour traiter les semences : FS
  - Poudre à disperser dans l'eau pour traiter les semences : WS
  - Poudre soluble dans l'eau pour traiter les semences : SS

Les poudres sont plus difficiles à faire adhérer aux semences, de plus elles dégagent une quantité importante de poussière dangereuse pour l'utilisateur. C'est pour cela que les formulations liquides sont plus fréquemment utilisées. Elles présentent également une meilleure répartition sur l'ensemble du lot et une absorption rapide de la substance active et sont faciles à utiliser (Pigeon, 2003; Turner, 2013).

Il existe trois techniques d'application des semences : le traitement des semences nues, le pelliculage et l'enrobage. Ces techniques sont comparées dans le **Tableau 5**.

Le traitement des semences nues est la méthode la plus ancienne, mais elle est toujours utilisée aujourd'hui. Les semences en mouvement sont mises en contact avec la formulation pouvant être liquide ou solide même si l'utilisation d'une bouillie permet une meilleure distribution. Cette technique ne nécessite pas de séchage. La charge appliquée sur la semence est d'environ 1000 fois inférieure à son poids (Abou, 1993; Commeau et Spire, 1996). Cette technique comporte certains désavantages tels que la difficulté à faire adhérer les substances sur des semences aux surfaces lisses et celles aux formes complexes comme les semences de betterave, le manque d'homogénéité aussi bien au sein du lot qu'au sein même d'une graine ainsi que le risque de lessivage élevé des substances actives lorsque la semence est mise en champ. Ces multiples inconvénients ont conduit au développement de l'enrobage et du pelliculage (Pigeon, 2003; Schiffers et Fraselle, 1988).

Le principe du pelliculage consiste en l'application d'un fin film continu et microporeux d'une substance inerte et biodégradable à la surface de la semence dans laquelle sont ajoutés les produits de protection de la plante (Commeau et Spire, 1996). Après évaporation du solvant, il ne reste plus qu'un fin verni autour de la graine. Si le solvant est autre que l'eau, son évaporation nécessite une étape de séchage. Cette technique ne modifie ni la taille ni la forme de la graine. La charge de solide déposée à la surface de la semence est de 100 à 1000 fois inférieure à son poids. Le pelliculage permet une bonne homogénéité et persistance du traitement ainsi qu'un relargage du produit étalé dans le temps (Commeau et Spire, 1996; Schiffers et Fraselle, 1988).

L'enrobage des semences consiste à appliquer des couches successives de formulation à la surface de la semence afin de modifier sa taille et sa forme en vue de faciliter le semis. Dès lors, la quantité de matière à la surface de la semence est augmentée d'un dixième à plusieurs fois le poids de la semence. Ce type d'enrobage permet d'augmenter la sélectivité du traitement puisque les substances actives devant pénétrer dans la semence seront mises dans les premières couches, alors que celles destinées à l'environnement adjacent seront mises dans les couches extérieures (Pigeon, 2006; Schiffers et Fraselle, 1988).

En fin de pelliculage et d'enrobage, une couche colorée est généralement ajoutée. Celle-ci permet de distinguer les semences traitées des non traitées et ainsi mettre en garde l'utilisateur (Pigeon, 2006; Schiffers et Fraselle, 1988).

### 3.2. Qualité du traitement

Il n'existe pas de norme concernant la qualité du traitement des semences. Cependant, certaines recommandations existent et doivent être satisfaites pour qu'un produit soit homologué. En effet, pour qu'un produit soit homologué il faut que son efficacité contre le ou les organismes cibles et sur les semences soit démontrée. Le produit formulé doit répondre aux normes établies par la FAO (2002) concernant ces propriétés physico-chimiques. Le PSD (Pesticide Safety Directorate, 2000) recommande également que la teneur minimale en matières actives dans un lot de semence soit supérieure à 70 % de la dose cible, aussi bien après le traitement qu'après le stockage des semences. Il est également préconisé que la teneur en matières actives ne dépasse pas 130 % de la dose cible afin d'éviter un surdosage des semences. De plus au sein d'un même lot, le coefficient de variation entre les semences ne doit pas dépasser 25 % (Pigeon, 2003; PSD, 2000).

Différents facteurs peuvent influencer la qualité du traitement des semences (Pigeon, 2006; Rensing et Sztor, 1992) :

- les propriétés physico-chimiques des substances actives et des formulations telles que leur capacité d'adhésion et leur stabilité.
- Le type d'espèce à traiter, leur forme, leur surface, leur poids.
- La qualité des semences à traiter, c'est-à-dire leur humidité, les conditions de stockage, la propreté, la présence de poussière.
- La technique d'application du traitement.

Pour garantir une efficacité maximale contre les pathogènes et les nuisibles, il est impératif que chaque graine soit correctement traitée. C'est pourquoi une bonne qualité du traitement des semences implique que la matière active soit répartie uniformément et au taux cible sur les semences. Dans le cas contraire, un sous-dosage peut conduire à un manque d'efficacité. Inversement, un surdosage accroît le risque de phytotoxicité en plus de ne pas être économiquement rentable (Pigeon *et al.*, 2000; Pigeon *et al.*, 2004).

En pratique, comme l'observent Suett *et al.* (1994) et Westwood *et al.* (1994), la taille des semences peut fortement varier au sein d'un lot, allant jusque 20% du poids pour les semences d'orge. Les semences les plus grosses sont alors surdosées inversement aux plus petites qui seront sous-dosées. Cette variation ainsi que les autres facteurs énoncés ci-dessus, engendrent des variations importantes de la teneur en matières actives d'une semence à l'autre.

Aujourd'hui les méthodes de référence pour déterminer la qualité du traitement des semences sont les méthodes chromatographiques. Elles permettent une analyse à la fois qualitative et quantitative des substances actives et ce avec une sélectivité, une sensibilité, une précision et une répétabilité élevées (Pigeon *et al.*, 2000). Mais ces méthodes de référence sont longues, coûteuses,

destructives et nécessitent une quantité importante de solvant. De plus chaque analyse doit être ajustée pour chaque substance active ou famille de substances actives et en fonction de l'espèce de semence analysée. Elles ne peuvent donc pas être appliquées à des grandes quantités de semences dans le cadre du contrôle en ligne, c'est pourquoi d'autres méthodes voient le jour.

En 1994, la méthode CIPAC MT n°175 est créée. Elle permet, par l'utilisation d'un colorimètre, de déterminer l'homogénéité d'un traitement entre les semences d'un lot. Pour ce faire, le colorant présent sur la graine est extrait et l'intensité de la couleur est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre visible. Cependant cette méthode nécessite que le colorant soit parfaitement soluble dans le solvant et que son intensité soit proportionnelle à la concentration en matières actives (Collaborative international pesticides analytical council (CIPAC), 1994).

En 1999 et 2003, O. Pigeon (2003) utilise un spectromètre proche infrarouge (FOSS NIRSystems 6500) pour détecter l'imidacloprid sur des semences de blé. Il analyse d'une part la concentration moyenne d'imidacloprid dans un lot et d'autre part la concentration graine par graine. Cette technique ne requiert aucune préparation d'échantillons et aucun solvant. Cependant cet instrument ne permet d'avoir que le spectre de la moyenne d'un groupe de semences ou d'une semence à la fois. Par conséquent, malgré le temps d'analyse rapide d'environ une minute par échantillon, le temps nécessaire pour analyser des lots de plus de 100 semences en graine par graine reste conséquent. C'est pourquoi ce mémoire aura pour objectif d'effectuer ces analyses en utilisant une caméra d'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée à un tapis roulant. Ce système analytique pourrait permettre d'analyser en un temps réduit un grand nombre de semences.

## 4. MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ANALYSE DES PESTICIDES DE DÉTECTION DES PESTICIDES

### 4.1. Méthodes classiques

L'analyse des pesticides se déroule en trois étapes. La première étape consiste à extraire les pesticides de la matrice. Cette étape requière l'utilisation de divers solvants, principalement l'acétone, l'acétonitrile, l'éthyle acétate ou encore le méthanol. La seconde étape est optionnelle, elle a pour but de purifier l'extrait obtenu afin de réduire au maximum les composés pouvant interférer lors de l'analyse. La purification se fait généralement sur phase solide (SPE) ou par extraction liquide-liquide (LLE) (Tadeo, 2008). L'étape finale est l'identification du ou des composés obtenus.

Les méthodes d'analyse utilisées pour la détection et la quantification de la présence de pesticides dans des matrices alimentaires sont nombreuses.

Les plus utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse (GC) (Jardim *et al.*, 2014; Stajnbaher et Zupancic Kralj, 2003; Yang *et al.*, 2011) et la chromatographie liquide à haute ou ultra performance (HPLC ou UPLC) (Bakirci, 2014; Jardim *et al.*, 2014) toutes deux couplées à un spectromètre de masse (MS). La chromatographie en phase gazeuse peut également être couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD) (Chen *et al.*, 2011; Jardim *et al.*, 2014; Koinecke *et al.*, 1994), un détecteur spécifique à l'azote ou au phosphore (GC-NPD) (Amvrazi et Tsiropoulos, 2008; Engel *et al.*, 2013; Slowik Borowiec *et al.*, 2014) et la chromatographie liquide à haute (ultra) performance avec un détecteur dans l'UV avec barrette de diodes (HPLC-DAD) (Topuz *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2014) ou un détecteur à fluorescence (HPLC-Fluo) (Yang et Wang, 2008).

Il existe des méthodes mono-résidu et multi-résidus. Ces dernières sont généralement préférées aux premières, car elles permettent de séparer, identifier et quantifier plusieurs pesticides simultanément (Fernandez Alba, 2008). Elles sont donc plus rapides et plus rentables que les méthodes mono-résidu qui n'analysent qu'un pesticide à la fois (Torres *et al.*, 1996). Les méthodes multi-résidus ne sont cependant pas capables de détecter tous les pesticides d'intérêt en une seule analyse (U.S. Congress, Office of technology assessment, 1988). Elles permettent généralement de détecter jusqu'à 300 composés (Fernandez Alba, 2008). Jansson *et al.* (2004) ont développé une méthode validée pour 57 pesticides et métabolites de pesticides. L'extraction des résidus se fait par l'acétate d'éthyle. La séparation et la détection se font par chromatographie liquide avec ionisation par électronébulisation associée à la spectrométrie de masse. Yang *et al.* (2011) ont identifié 88 pesticides dans des fruits rouges par extraction en phase solide-liquide et détection par chromatographie gazeuse couplé avec un spectromètre de masse et Stajnbaher et Zupancic Kralj (2003) ont détecté 90 pesticides dans des fruits et légumes par extraction à l'acétone et détection par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Les méthodes multi-résidus sont cependant parfois difficiles à mettre en œuvre en raison des différentes polarités, solubilités, volatilités et pKa des pesticides. C'est pourquoi des méthodes spécifiques existent également (Stajnbaher et Zupancic Kralj, 2003).

La technique QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) est une méthode de détection multi-résidus simple, rapide, efficace, bon marché, robuste et sans danger pour détecter les résidus de pesticides sur les fruits, les légumes et les céréales (Chemisches und veterinäruntersuchungsamt Stuegardt (CVUA Stuttgart), 2011). Elle est basée sur une extraction à l'acétone nitrile et une détermination par chromatographie en phase liquide ou par la

chromatographie gazeuse couplé à la spectroscopie de masse (LC-MS ou GC-MS) (Lehotay *et al.*, 2010; Wilkoxaska et Biziuk, 2011). Golge et Kabak (2015) ont pu détecter 109 pesticides dans des tomates en utilisant cette technique couplée à la chromatographie liquide et à un spectromètre de masse et Kolberg *et al.* (2011) ont montré la présence de 24 pesticides dans des échantillons de blé, de farine blanche et de son de blé en couplant la méthode QuEChERS à la chromatographie gazeuse et à un spectromètre de masse (GC-MS).

Malgré la haute précision de ces méthodes, elles présentent un grand nombre d'inconvénients. En effet, en plus du temps long nécessaire à la détection et de la nature destructive de ces méthodes, elles requièrent une préparation parfois complexe des échantillons, des solvants et du personnel qualifié pour les différentes préparations. De plus les modes opératoires à utiliser dépendent du type de pesticides recherché, ce qui entraîne donc que les pesticides présents dans la matrice doivent être préalablement connus. Enfin, elles sont généralement coûteuses et limitées à la détection de quelques échantillons. Ces techniques sont par conséquent restreintes aux analyses en laboratoire (Dhakal *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006).

C'est pourquoi de nouvelles méthodes d'analyses voient le jour afin de répondre à la demande des industries agroalimentaires pour des techniques d'analyses rapides, non destructives et sans préparation d'échantillons (Dhakal *et al.*, 2014). C'est le cas de l'utilisation de biocapteurs, tel que des enzymes, comme élément de détection des pesticides. Cette technique est basée sur la corrélation entre la toxicité d'un pesticide et la modulation de l'activité d'une enzyme. Par exemple, les pesticides organophosphorés inhibent sélectivement les enzymes cholinestérasés en bloquant le groupe sérine du site actif par une attaque nucléophile. Dès lors, en mesurant l'activité enzymatique avant et après incubation du biocapteur dans une solution contenant des pesticides, la concentration en pesticide de la solution peut être déterminée (Liu *et al.*, 2012; Simonian *et al.*, 2001).

Une autre méthode est l'utilisation de la spectroscopie. Zhang *et al.* (2006) arrivent à détecter quatre résidus de pesticides par la spectroscopie de Raman à transformée de Fourier.

Ces dernières années, la spectroscopie de Raman a gagné en importance pour la détection des pesticides et de leurs résidus dans les fruits (Dhakal *et al.*, 2014). En utilisant la spectroscopie de Raman exaltée de surface (SERS<sup>3</sup>) Wang *et al.* (2014) parviennent à détecter des résidus de phosmet<sup>4</sup> et disulfoton<sup>5</sup> sur les oranges en utilisant des nanoparticules d'or enrobées d'un copolymère de GMA-EDMA<sup>6</sup> pour augmenter la sensibilité de la détection. Liu *et al.* (2012) utilisent des nanoparticules d'argent pour amplifier le signal de Raman et ainsi détecter la présence de trois résidus de pesticides, le thirame<sup>7</sup>, chlorpyrifos<sup>8</sup> et le parathion méthyl<sup>9</sup> sur les pelures de fruits. En 2013, He *et al.* (2014) vont encore plus loin en frottant simplement une pomme avec un coton-tige avant de le mettre dans le méthanol pour libérer le thiabendazole<sup>10</sup> puis dans une solution de nanoparticules d'argent. Ces travaux sont innovateurs, mais toujours destructifs pour l'échantillon et coûteux.

---

<sup>3</sup> Surface enhanced Raman spectroscopy

<sup>4</sup> Insecticide organophosphoré

<sup>5</sup> Acaricide

<sup>6</sup> (méthacrylate de glycidyle)-(diméthacrylate d'éthylène)

<sup>7</sup> Fongicide

<sup>8</sup> Insecticide organophosphoré

<sup>9</sup> Insecticide organophosphoré

<sup>10</sup> Fongicide

Pour combler les lacunes des techniques précédentes, Dahkal *et al.* (2014) développent un prototype équipé de la spectroscopie de Raman dans le but de détecter les résidus de pesticides à la surface des pommes et par la suite pouvoir classer les pommes, contaminées ou non, en se basant sur le seuil minimum détectable. Après avoir nettoyé et imprégné les pommes de différents pesticides en différentes concentrations, ils font tourner la pomme autour de son axe à l'aide d'un rotor ce qui permet de prendre des mesures à différents points le long de la région équatoriale (**Figure 6**). Cette méthode leur permet de détecter des concentrations de 6,69 mg/kg de pesticides à la surface de la pomme. Néanmoins, à aucun moment ils n'ont analysé la pomme simplement nettoyée. Dès lors, il est possible que certains pics identifiés comme caractéristiques des pesticides soient des pics caractéristiques de la pomme.

La spectroscopie infrarouge peut également être une alternative aux méthodes de chromatographie. Cette technique permet déjà de déterminer la qualité des aliments en analysant leurs propriétés physiques et chimiques. Teye *et al.* (2013) montrent qu'il est possible de détecter les résidus de pesticides dans des matrices alimentaires en utilisant le proche infrarouge (NIR).

## 4.2. Spectroscopie infrarouge

### 4.2.1. Introduction

La spectroscopie est l'étude des interactions entre les différents types de rayonnement et la matière (Farré *et al.*, 2008). Elle permet de répondre à la demande de l'industrie pour des analyses rapides, non destructives et meilleur marché. De plus, cette technique ne nécessite généralement pas l'utilisation de solvant, ce qui minimise fortement le coût des analyses ainsi que leur impact sur l'environnement.

Les techniques d'analyses en spectroscopie sont basées sur l'utilisation des propriétés physiques de la matière et peuvent être divisées en deux classes : d'une part la spectroscopie photonique relative à l'interaction du substrat avec un champ électromagnétique. Cette première classe reprend la majorité des méthodes utilisées dans le cadre des analyses rapides. D'autre part, la spectroscopie des particules qui porte sur l'interaction des particules moléculaires, atomiques ou subatomiques, interagissant avec la matière ou générées par celle-ci (Bertrand et Dufour, 2000; Wilson, 1994). Cette seconde classe recouvre essentiellement les méthodes d'analyses du rapport entre la masse et la charge de molécules ionisées (Bertrand et Dufour, 2000).

### 4.2.2. Théorie

#### Le spectre électromagnétique

Nous sommes tous les jours exposés à des ondes électromagnétiques : les ondes radio en écoutant la radio, les micro-ondes avec les téléphones, les radars ou les fours, les ondes infrarouges pour les télécommandes, le visible pour les ampoules, les ultraviolets dans les bancs solaires, les rayons X en médecine pour les radiographies et enfin les rayons gamma émis par les matériaux radioactifs (Gratien, 2008).

La **Figure 7** (Department of chemistry and biochemistry, 2002) présente les différents domaines du spectre électromagnétique. À chacun de ces domaines est associé un ou plusieurs types de spectroscopie en fonction de l'interaction du rayonnement avec la matière comme l'expliquent Bertrand et Dufour (2000).

Les régions où le rayonnement est très énergétique, c'est-à-dire celles des rayons gamma (longueurs d'onde situées entre 0,01 et 0,05 nm) et celles des rayons X (0,05 – 10 nm), vont

impliquer un changement d'énergie des électrons présents dans les couches internes des atomes et des molécules.

L'ultraviolet est le domaine principal de l'émission de luminescence sous forme de fluorescence ou de phosphorescence en fonction de la nature de la transition électronique impliquée. La partie de l'ultraviolet lointain (20 - 200 nm), où l'énergie est encore fortement élevée, implique la transition d'électrons dans la dernière couche électronique des atomes (orbitale de valence). Dans le cas de l'ultraviolet proche (200 – 400 nm) ce sont des transitions électroniques qui ont lieu au niveau des orbitales de valences. Cette technique est intéressante pour la caractérisation des molécules insaturées telles que les composés aromatiques, les lipides insaturés et certaines vitamines comme la vitamine A.

Au-delà de l'identification des couleurs, la plage du visible (400 – 780 nm) est également le lieu de transitions électroniques.

L'infrarouge (780 -  $10^5$  nm) est la région du spectre électromagnétique la plus adaptée aux analyses agroalimentaires c'est pourquoi elle sera détaillée par la suite. Cette partie du spectre peut être divisée en 3 zones :

- Le proche infrarouge (PIR) ou en anglais « near infrared (NIR) » (780 – 2500 nm ou  $12820 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ).
- Le moyen infrarouge (MIR) ou « mid infrared (MIR) » (2500 – 25000 nm ou  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ).
- L' infrarouge lointain (IRL) ou « far infrared (FIR) » ( $25000 - 10^5$  nm ou  $400 - 100 \text{ cm}^{-1}$ ).

Les phénomènes impliqués en infrarouge sont des vibrations moléculaires engendrées par l'absorption de lumière. Néanmoins, les vibrations fondamentales se déroulent dans le moyen infrarouge. En proche infrarouge, on se trouve dans la région des harmoniques et des bandes de combinaisons. Et enfin, l'infrarouge lointain est le lieu de rotation et de vibration du squelette des polymères.

Les micro-ondes (100  $\mu\text{m}$  – 1 cm) permettent l'absorption d'énergie via des rotations moléculaires, mais sont très peu utilisées en analyse agroalimentaire.

Les fréquences radio (1 cm – 10 m) combinées à la présence d'un champ magnétique peuvent provoquer des changements énergétiques entraînés par le renversement de spin d'électrons ou de noyaux. C'est ce qu'on appelle la résonance magnétique nucléaire (RMN) lorsqu'elle concerne les noyaux atomiques et la résonance électronique de spin pour les électrons. Ces techniques sont essentiellement utilisées pour doser l'eau, les lipides ou les protéines dans des matrices alimentaires.

### **Le rayonnement électromagnétique**

Malgré certaines différences, telles que leur fréquence, le principe de base sur lequel se repose le proche infrarouge, le moyen infrarouge et l'infrarouge lointain est le même.

L'infrarouge, comme toute source lumineuse, est un rayonnement électromagnétique qui peut être considéré comme un photon en utilisant la fréquence,  $\nu$ , exprimé en Hertz comme unité de référence. (Johnson, 2003).

Par ailleurs, le rayonnement électromagnétique peut également être caractérisé comme une onde se propageant à la vitesse de la lumière ( $c = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ ). On parle alors de longueur d'onde,  $\lambda$ , exprimée généralement en nanomètre (nm). La longueur d'onde représente « la distance linéaire

entre deux maxima ou minima successifs de cette onde » (Bertrand et Dufour, 2000). De la même façon on peut parler de nombre d'ondes,  $\nu'$ , exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ , qui est l'inverse de la longueur d'onde, c'est-à-dire le nombre de cycles effectués par l'onde sur un centimètre (Johnson, 2003).

Ces différentes grandeurs caractéristiques des ondes électromagnétiques sont liées entre elles :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad \nu' = \frac{10^7}{\lambda}$$

L'énergie d'un rayonnement électromagnétique ( $E_p$ ) peut également être reliée à sa longueur d'onde et sa fréquence par l'équation suivante :

$$E_p = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Avec  $h$  la constante de Plank égale à  $6,6268 \times 10^{-34}$  joules seconde.

L'absorption de photons par une molécule implique un transfert d'énergie pouvant conduire la molécule à un état vibrationnel supérieur (**Figure 8**). Néanmoins, pour qu'une molécule puisse absorber cette énergie il est nécessaire que la fréquence du photon ou de la lumière soit identique à celle de la liaison intermoléculaire. Les oscillateurs harmoniques et anharmoniques permettent de clarifier ce phénomène (Bertrand, 2002; Bertrand et Dufour, 2000; Fatela, 2012).

### L'oscillateur harmonique

Pour mieux comprendre la spectroscopie infrarouge et les vibrations d'une molécule diatomique, on peut les considérer comme deux masses ( $m_1$  et  $m_2$ ) reliées entre elles par un ressort de force  $K$ . En considérant  $q$  comme la distance entre la position de la particule par rapport à sa position à l'équilibre respectivement  $r$  et  $r_{eq}$  et en supposant que le ressort répond à la loi de Hooke, on peut exprimer la force  $F$  exercée sur la particule comme (Bertrand, 2002; Fatela, 2012) :

$$F = -K(r - r_{eq}) = -Kq$$

Leur fréquence d'oscillation harmonique,  $\nu_h$ , est donnée par l'équation suivante :

$$\nu_h = \frac{1}{2\pi} \sqrt{K \left( \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)}$$

On peut dès lors trouver les niveaux d'énergie  $E_v$  (exprimée en joules) de la molécule en résolvant l'équation de Schrödinger. La parabole dessinée par l'énergie est illustrée dans la **Figure 9** et définie par l'équation :

$$E_v = \left( V + \frac{1}{2} \right) h\nu_h$$

Avec  $V$  le nombre quantique de vibrations (Bertrand, 2002).

Cependant le modèle harmonique ne permet que de calculer approximativement la position des bandes fondamentales puisque l'on a considéré que les liaisons interatomiques étaient parfaitement élastiques alors qu'en réalité lorsque l'étirement entre les atomes devient trop important la liaison peut se briser. Dès lors, l'utilisation de ce modèle sera limitée aux vibrations de faibles amplitudes (Bertrand, 2002; Bertrand et Dufour, 2000).

### L'oscillateur anharmonique

Le modèle de l'oscillateur anharmonique permet de tenir compte du risque de dissociation des atomes en cas d'étirement trop important, ainsi que du fait qu'une compression trop intense entraîne une augmentation d'énergie plus intense que le prédit la loi de Hooke dans le modèle harmonique (**Figure 9**).

Une des nombreuses équations proposées pour estimer ce modèle anharmonique est celle du potentiel de Morse :

$$E = D_e [1 - e^{(1-\alpha(r-r_{eq}))}]^2$$

Où  $D_e$  est l'énergie de dissociation (joules) et  $\alpha$  une constante caractéristique de la liaison interatomique. La résolution de l'équation de Schrödinger donne une nouvelle équation pour les niveaux d'énergie  $E_v$  de la molécule:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu_a - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 h\nu_a X_e$$

Avec  $X_e$  une constante de l'anharmonicité et  $\nu_a$  la fréquence d'oscillation anharmonique. On peut également trouver les fréquences de la bande fondamentale et de ses harmoniques  $\nu_i$  :

$$\nu_i = \nu_a [1 - (i + 1)X_e]$$

On peut constater, étant donné que  $X_e$ , prend une valeur positive et faible, que les valeurs de la fréquence fondamentale et des deux harmoniques suivantes seront proches des valeurs calculées avec le modèle harmonique.

Il ne faut pas oublier que les modèles anharmoniques ne sont que des approximations de l'anharmonicité réellement observée. D'autres modèles que celui de Morse existent, certains plus précis, auxquels il est rajouté des termes de degrés supérieurs (Bertrand, 2002; Bertrand et Dufour, 2000; Fatela, 2012; Larkin, 2011; Mendham, 2006).

### Les molécules polyatomiques

Si l'on considère maintenant une molécule constituée de  $N$  atomes, elle possède  $3N$  degrés de liberté puisque chaque atome peut être localisé par ses coordonnées cartésiennes :  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Néanmoins, la molécule n'étant pas figée, il faut donc retirer 3 degrés de liberté pour les rotations et 3 pour les translations pour les molécules non linéaires. Il ne reste donc plus que  $3N-6$  degrés de liberté pour les vibrations fondamentales. En ce qui concerne les molécules linéaires, le nombre de vibrations fondamentales est de  $3N-5$  puisque seulement 2 degrés sont enlevés pour les rotations en plus des 3 degrés de translation (Bertrand et Dufour, 2000; Department of chemistry and biochemistry, 2002; Osborne *et al.*, 1993; Van der Maas, 1972).

Ces vibrations peuvent être de deux types (**Figure 10**) :

- Les vibrations d'élongation se déroulent dans le plan avec une modification de la distance interatomique
- Les vibrations de déformation peuvent sortir du plan et entraînent un changement de l'angle entre les atomes. Ces vibrations sont divisées en quatre groupes en fonction de leur mouvement : balancement, torsion, rotation plane ou cisaillement.

Cependant, toutes ces vibrations ne sont pas actives en infrarouge. En effet, pour qu'une vibration soit active en infrarouge, il faut qu'elle entraîne un changement du moment dipolaire de la molécule,  $\mu$ . Celui-ci dépend de la charge des atomes,  $q_i$ , ainsi que de leur position,  $r_i$  :

$$\mu = \sum q_i r_i$$

L'absorption d'énergie dans l'infrarouge par la molécule résulte en une modification du niveau d'énergie vibrationnel. C'est ce phénomène qui est observable en infrarouge. L'intensité des bandes en spectroscopie infrarouge est proportionnelle à la variation du moment dipolaire (Larkin, 2011). C'est pourquoi les molécules diatomiques homonucléaires, telles que  $H_2$  et  $O_2$ , ne sont pas actives en infrarouge puisqu'elles ne possèdent pas de moment dipolaire contrairement aux molécules diatomiques hétéronucléaires (Larkin, 2011).

Chaque mode de vibration, entraînant un changement du moment dipolaire, correspond à une fréquence fondamentale particulière, mais aussi à des fréquences liées aux vibrations harmoniques. En outre, l'association de vibrations de plusieurs liaisons peut également correspondre à une fréquence, combinaison linéaire des fréquences des bandes fondamentales de ces liaisons. Les bandes résultant de ces interactions sont appelées bandes de combinaison. Ces bandes de combinaison, comme les harmoniques, se manifestent à des fréquences plus élevées correspondant à la région du proche infrarouge. Les bandes fondamentales sont détectées dans le moyen infrarouge (Bertrand, 2002; Fatela, 2012).

#### 4.2.3. Mesure spectrale

Une fois la matière en contact avec la radiation, celle-ci peut être absorbée, transmise et / ou réfléchi par l'échantillon. C'est l'absorption d'énergie qui va être mesurée par la spectroscopie infrarouge (Fatela, 2012).

Comme l'illustre la **Figure 11**, lorsque la lumière incidente,  $I_0$ , entre en contact avec l'échantillon, une partie va traverser l'échantillon et en ressortir avec une intensité  $I_T$ , qui est donc l'intensité transmise. Le rapport entre ces deux intensités est appelé la transmittance,  $T$  :

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

Dès lors, en prenant le logarithme de l'inverse de la transmittance, on peut trouver l'absorbance  $A$  définie par la loi de Lambert-Beer comme :

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon c l$$

Avec  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction ou l'absorption molaire pour une longueur d'onde définie,  $c$  la concentration du composé absorbant et  $l$  son épaisseur (Fatela, 2012; Pigeon, 2003).

Il arrive qu'une partie de la lumière soit diffusée par la matière. Cela signifie qu'une partie du faisceau lumineux est détourné par la matière de façon à ce qu'il ne traverse pas l'échantillon. Le phénomène de diffusion regroupe la réfraction, la réflexion et la diffraction de la lumière (**Figure 12**). Il y a réfraction quand la direction du faisceau lumineux change brusquement lors de sa pénétration dans la matière (Taillet *et al.*, 2009). La réflexion est le changement de direction de la lumière lorsqu'elle atteint une surface (Balland, 2007) et la diffraction dispersion de la lumière lors du contact avec la matière (Taillet *et al.*, 2009).

#### 4.2.4. Instrumentation

Un spectromètre, aussi bien en moyen qu'en proche infrarouge, est constitué de quatre éléments principaux (Nicolai et al., 2007) : une source de lumière, un séparateur de longueurs d'onde, un présentoir pour l'échantillon et un détecteur.

##### Sources lumineuses

Il existe différentes sources lumineuses utilisées en spectroscopie infrarouge. Ces sources doivent idéalement émettre une énergie constante afin d'obtenir un spectre continu sur toute la région de l'infrarouge (Van der Maas, 1972). Les plus fréquemment utilisées sont les sources thermiques. Elles sont le résultat de l'échauffement d'un filament métallique parcouru par un courant électrique. Ces filaments sont généralement en tungstène en proche infrarouge et en globar (SiC) ou en Nichrome en moyen infrarouge (Bertrand et Dufour, 2000). Les sources thermiques fournissent une radiation stable, de forte intensité et ce sur une grande plage de longueurs d'onde, réduisant ainsi les problèmes d'amplification du signal (Bertrand et Dufour, 2000).

Une alternative aux sources thermiques peut être l'utilisation de diodes électroluminescentes (LED). Cette source émet des photons en recombinaison de deux semi-conducteurs à base de gallium, l'un ayant acquis une conduction par électron et l'autre une conduction par « trou d'électron »<sup>11</sup>. Les diodes électroluminescentes n'émettent qu'une bande étroite de longueurs d'onde, mais très stable. De plus, contrairement aux sources thermiques, elles peuvent être allumées et éteintes rapidement.

Enfin, des lasers ou des diodes à laser peuvent également être utilisés. Néanmoins, ils ne génèrent que des photons correspondant à une longueur d'onde fixe et sont relativement coûteux (Bertrand et Dufour, 2000).

##### Séparateurs de longueurs d'onde

La discrimination des longueurs d'onde peut se faire par des spectromètres dispersifs utilisent généralement un monochromateur ou par des spectromètres non-dispersifs qui utilisent des filtres ou la transformée de Fourier.

La manière la plus courante de les séparer se fait par un monochromateur à réseau. Le faisceau lumineux pénètre à travers une fente d'entrée et percute le monochromateur avant de ressortir par une fente de sortie à une longueur d'onde choisie ultérieurement. Pour changer la longueur d'onde finale, il suffit de faire tourner le monochromateur. Plus la fente est fine, meilleure sera la résolution, mais la quantité de lumière transmise sera plus faible. En proche infrarouge, plusieurs longueurs d'onde peuvent avoir le même angle de diffraction, dans ce cas il est nécessaire d'ajouter un filtre pour extraire les longueurs d'onde non désirées (Larkin, 2001).

Il est également possible de séparer les longueurs d'onde en utilisant des filtres qui ne transmettent qu'une gamme étroite de longueurs d'onde de la lumière incidente. Pour ce faire il existe deux types de filtres. Les filtres tournants sur lesquels le rayon arrive perpendiculairement et les filtres basculants où l'angle varie en fonction de la plage de longueurs d'onde souhaitée (**Figures 13 et 14**). Le spectromètre à transformée de Fourier permet de moduler la radiation incidente. En effet, une séparatrice permet de séparer le rayon incident en deux. Les deux rayons résultants de cette séparation vont parcourir des chemins différents et en se recombinaison vont

---

<sup>11</sup> Trou d'électron : absence d'un électron dans une bande d'énergie.

former un faisceau recombinaison qui sera envoyé vers l'échantillon. (Bertrand et Dufour, 2000; Siesler *et al.*, 2002).

### Détecteurs

Le détecteur a pour but de convertir le faisceau infrarouge en un signal électrique. Deux types de détecteurs sont utilisés en spectroscopie infrarouge : les détecteurs thermiques et les détecteurs photoconductifs (Bertrand et Dufour, 2000).

Les détecteurs thermiques produisent un signal proportionnel à la chaleur produite par la lumière. Trois catégories de détecteurs se distinguent en fonction de la façon dont la chaleur est convertie en signal électrique (Szymanski, 1966). Le plus courant est le détecteur thermocouple, il est composé de deux métaux ou semi-conducteurs de matières différentes. Une de ces deux parties est recouverte d'un film noir absorbant les radiations. La différence de température avec l'autre partie va créer une différence de potentiel qui sera mesurée par un voltmètre. Pour amplifier le potentiel mesuré, plusieurs thermocouples peuvent être connectés. Ce réseau de thermocouples est alors appelé thermopile (Bertrand et Dufour, 2000; szymanski, 1966; Van der Maas, 1972). Un second détecteur thermique est le bolomètre. Il s'agit d'un fil métallique ou semi-conducteur intégré dans un pont de Wheatstone<sup>12</sup> initialement équilibré. L'échauffement du fil causé par la radiation va déséquilibrer le pont permettant de mesurer l'énergie du rayon (Gillet, 2010; Szymanski, 1966). Le troisième détecteur thermique est le détecteur pneumatique, dont le principal est le détecteur de Golay. C'est un thermomètre à gaz extrêmement sensible. L'augmentation de température engendrée par le rayon lumineux entraîne une dilatation du gaz xénon contenue dans la cellule de Golay. Le gaz va alors créer une pression sur le diaphragme de la cellule sur laquelle se trouve un miroir. Le miroir réfléchissant une lumière incidente va voir son orientation modifiée. La lumière réfléchie reçue par la photocathode va par conséquent être modifiée engendrant ainsi une modification de l'intensité électrique mesurée (Gillet, 2010; Szymanski, 1966; Van der Maas, 1972).

Les détecteurs photoconductifs sont essentiellement utilisés en proche infrarouge. Un fin fil du semi-conducteur est placé sur un support isolant. Des photons du rayon incident vont être absorbés par le semi-conducteur provoquant des charges électriques qui vont entraîner une variation de la conductivité mesurée par le détecteur (Bertrand et Dufour, 2000).

---

<sup>12</sup> Instrument utilisé pour mesurer une résistance électrique.

### III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

Les méthodes d'analyse en spectroscopie proche infrarouge (SPIR) sont rapides et non destructives. Néanmoins, ces méthodes nécessitent un étalonnage par une méthode de référence. La méthode d'analyse utilisée pour obtenir les valeurs de référence est la chromatographie liquide à ultra performance (UPLC). Cette section présente les sets d'échantillons qui ont été analysés, les trois méthodes analytiques utilisées incluant une description de l'instrumentation et des modes opératoires, et finalement une description des méthodes de traitement de données et la méthodologie suivie.

#### 1. DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

##### Échantillons de semences

85 échantillons de semences de blé, d'orge et d'épeautre ont été rassemblés. Ces échantillons ont été prélevés dans des sacs de semences traitées destinées aux semis des essais variétés du CRA-W. Une pelle de mesure a permis de récolter des échantillons d'environ 200 g par sac de semences. On trouve parmi ces échantillons des semences de blé, d'orge et d'épeautre, certains traités, d'autres non traités. Pour chaque échantillon les informations disponibles sur l'étiquette du sac ont été répertoriées et résumées dans l'**Annexe 1**. Les échantillons prélevés viennent de différents producteurs de semences et sont tous de variétés différentes.

Le **Tableau 6** résume les différents traitements appliqués aux semences récoltées, leur teneur en substances actives, leur type d'action ainsi que les espèces de céréales ayant reçu le traitement.

Les échantillons peuvent être rangés dans différentes classes selon l'espèce à laquelle ils appartiennent, s'ils sont non traités ou traités et, dans le cas échéant, avec quelle formulation ils ont été traités.

Les différents produits formulés utilisés pour traiter nos échantillons sont nombreux et certains contiennent les mêmes matières actives. C'est pourquoi ces formulations sont regroupées en trois classes. Le groupe 1 correspond au traitement Kinto Duo et donc aux matières actives prochloraz et triticonazole. Le groupe 2 est composé des formulations contenant du prothioconazole, c'est-à-dire les formulations Redigo, Redigo Deter, Argento et du mélange Redigo, Gaucho350 et Langis. Le groupe 3 regroupe les autres traitements qui contiennent tous du fludioxonil, à savoir les formulations Vibrance Gold, Landor ct et tous les Celest dont la formulation Beret Gold fait partie. Pour chaque groupe, nous disposons également de la formulation d'un des produits : le Kinto Duo pour le groupe 1, Le Redigo pour le groupe 2 et le Beret gold pour le groupe 3. Le **Tableau 7** résume le nombre d'échantillons disponible appartenant à ces différentes classes. Parmi les échantillons de blé traités, le n° 28 ne comportait pas d'information sur la formulation utilisée pour le traiter. Il ne sera donc pas classé dans une des trois classes de formulations.

Pour les analyses en dosage moyen, les échantillons traités pour deux formulations sont analysés en chromatographie. Ces formulations sont le Kinto Duo et le Redigo. En effet, ce sont les deux produits qui ressortent le plus souvent dans les échantillons disponibles. De plus, les trois matières actives de ces deux formulations peuvent être extraites et analysées simultanément en suivant le même protocole.

Pour les analyses en semence par semence, c'est le Kinto Duo qui est sélectionné puisque c'est la seule formulation dont nous disposons d'échantillons traités pour chacune des trois espèces. Parmi les échantillons traités au Kinto Duo, deux ont été sélectionnés par espèce pour les analyses en semence par semence. Ces échantillons sont choisis sur base des valeurs chromatographiques obtenues sur le dosage moyen de façon à couvrir la gamme des teneurs en matières actives. Le premier échantillon sélectionné est celui dont la teneur moyenne en matières actives est la plus faible, et le second la plus élevée. Pour chacun de ces échantillons, 96 semences ont été analysées par le Burgermetrics line scan. 24 de ces 96 semences ont été choisies sur base de leur variabilité spectrale pour être analysées par chromatographie ultra performante.

### Échantillons de pesticides

Grâce aux divers collaborateurs du CRA-W, les formulations pures des traitements Kinto Duo, Redigo et Beret gold ont pu être obtenues. Ces formulations sont analysées sous forme liquide avec le Bruker MPA et sous forme solide avec le Burgermetrics line scan. Ces formulations ont été obtenues auprès des fabricants suivants :

- Kinto Duo (60 g/l prochloraz, 20 g/l triticonazole), BASF, Waterloo, Belgique.
- Redigo (100 g/l prothioconazole), BASF, Waterloo, Belgique.
- Beret Gold (25 g/l fludioxonil), BASF, Waterloo, Belgique.

Les matières actives du Kinto Duo et du Redigo ont également pu être obtenues auprès des fournisseurs suivants afin de confectionner les solutions de référence nécessaires aux analyses chromatographiques :

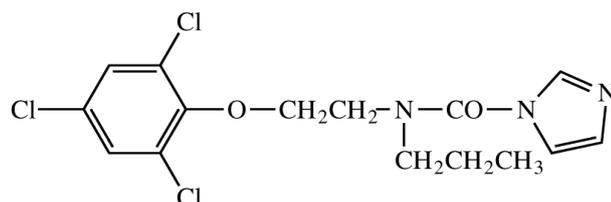
- Prochloraz ( $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2 \geq 98,5 \%$ ), Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA.
- Triticonazole ( $C_{17}H_{20}ClN_3O \geq 93,4 \%$ ), Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA.
- Prothioconazole ( $C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS \geq 95,7 \%$ ), Dr. Elrenstorfer, Augsburg, Allemagne.

Les matières actives prochloraz et prothioconazole ont également pu être analysées par le Bruker MPA. Ne disposant plus de triticonazole et pas de fludioxonil, ces matières actives n'ont pas pu être analysées. Les analyses de ces matières actives n'ont pu être réalisées en caméra hyperspectrale proche infrarouge en raison des quantités trop faibles de matière disponible (0,2 mg).

### Description des formulations et matières actives

La formulation Kinto Duo est un fongicide utilisé pour la lutte contre les principales maladies fongiques, c'est-à-dire la fusariose, le charbon nu, la carie commune et la helminthosporiose. Il est utilisé sous forme de suspension concentrée humide pour traiter les semences de blé, d'orge, d'épeautre, de seigle, de triticale et d'avoine. Le prochloraz (60 g/l) et le triticonazole (20 g/l) sont les deux matières actives du Kinto Duo (BASF, 2015; Service public fédéral, s.d.).

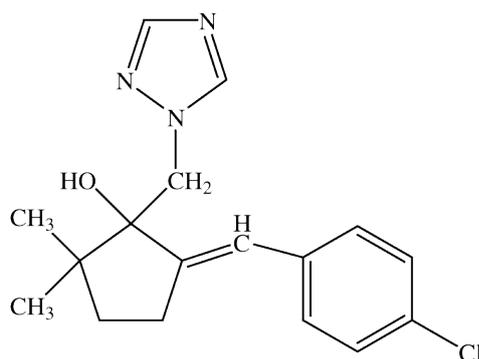
Le prochloraz est un fongicide imidazole. Il est actif contre un large éventail de maladie, aussi bien pour les cultures en champs que pour les fruits et les légumes (University of Hertfordshire, 2015). Sa formule chimique est reprise dans la **Figure 15**.



**Figure 15 : Formule chimique du prochloraz.** Son nom UPAC est *N*-propyl-*N*-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide. (Farm chemical international (FCI), 2015; University of Hertfordshire, 2015).

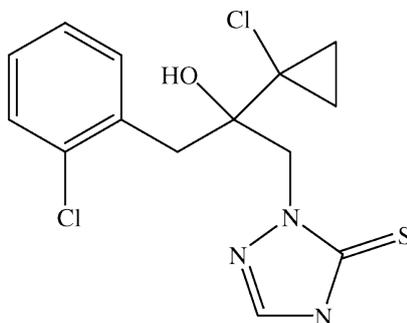
Le triticonazole est un fongicide triazole. Il est utilisé dans le traitement des semences pour contrôler la carie, le charbon nu et couvert du blé de l'orge et de l'avoine (University of Hertfordshire, 2015). La **Figure 16** représente sa formule chimique.

La formulation Redigo est également un fongicide à large spectre d'action, notamment contre la fusariose, le charbon nu et couvert, la septoriose et l'helminthosporiose. Comme le Kinto Duo, le Redigo est utilisé sous forme de suspension concentrée humide pour traiter les semences de blé, d'orge, d'épeautre, de seigle, de triticale et d'avoine. Le prothioconazole (25 g/l) est la substance active du Redigo (Bayer, 2015; Service public fédéral, s.d.).



**Figure 16 : Formule chimique du triticonazole.** Son nom UPAC est (RS)-(E)-5-(4-chlorobenzylidene)-2,2-diméthyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)cyclopentanol (FCI, 2015; University of Hertfordshire, 2015).

Le prothioconazole est un fongicide triazole. Il est utilisé dans les céréales pour le traitement des semences et la pulvérisation foliaire contre diverses maladies (University of Hertfordshire, 2015). Sa formule chimique est présentée dans la **Figure 17**.



**Figure 17 : Formule chimique du prothioconazole.** Son nom UPAC est (RS)-2-[2-(1-chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-hydroxypropyl]-2,4-dihydro-1,2,4-triazole-3-thione (FCI, 2015; University of Hertfordshire, 2015).

## 2. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À ULTRA PERFORMANCE

Afin de calibrer les analyses infrarouges, des analyses en chromatographie liquide à ultra performance sont réalisées. Cette méthode permet d'une part de mesurer la teneur moyenne en matières actives dans un lot de semences (dosage moyen) et d'autre part de mesurer la teneur en matières actives sur des semences individuelles (dosage semence par semence) de manière à déterminer la distribution du traitement au sein du lot. Les concentrations des substances actives obtenues serviront de valeurs de référence pour les analyses infrarouges.

### 2.1. Réactifs

Les solvants utilisés pour les analyses réalisées sur les semences en chromatographie ont été obtenus auprès des fabricants suivants :

- Acétonitrile HPLC-R ( $C_2H_3N \geq 99,9\%$ ), Biosolve Chimie, Dieuze, France.
- Acétonitrile ULC/MS ( $C_2H_3N \geq 99,97\%$ ), Biosolve Chimie, Dieuze, France.
- Eau ULC/MS ( $H_2O \geq 99,9\%$ ), Biosolve Chimie, Dieuze, France.

### 2.2. Appareillage

La chromatographie liquide à ultra performance (Waters Acquity) (**Figure 18**) est composée, en partant du haut de l'appareil, d'un détecteur UV à barrette de diodes (PDA UPLC LG 500 nm), d'un four pouvant abriter quatre colonnes, d'un gestionnaire d'échantillons, comprenant un injecteur automatique et un thermorégulateur pouvant maintenir la température des échantillons entre 4 et 40 °C, et d'un gestionnaire de solvants avec pompes binaires au nombre de quatre (A1, A2, B1 et B2). La pression maximale est de 15 000 PSI et le débit de 10  $\mu$ l/min à 2 ml/min en fonction de la taille de la colonne et de la pression. Les solvants sont situés au sommet de la tour (Waters, 2015). Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données est Empower.

### 2.3. Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen

Le dosage moyen des matières actives par échantillon a été réalisé pour les traitements Kinto Duo et Redigo puisqu'ils représentent la majorité des traitements de nos échantillons. De plus, le Kinto Duo est le seul traitement appliqué sur les trois espèces de semences.

Le **Tableau 8** reprend les teneurs en matières actives des formulations Kinto Duo et Redigo.

**Tableau 8 : Composition en matières actives des formulations Kinto Duo et Redigo.**

Formulation	Matière active	Concentration (g/l)
Kinto Duo	Prochloraz	60
	Triticonazole	20
Redigo	Prothioconazole	100

Avant d'effectuer les analyses, des solutions de référence sont préparées pour chaque matière active. Pour ce faire, environ 100 mg de matières actives sont pesés dans un ballon jaugé. La mesure se fait par une balance analytique dont la précision est de 0,1 mg. Une fois pesée, 100 ml d'un mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v) est ajouté à la matière active. 10 ml de chacune des

solutions concentrées en matières actives sont prélevés et transférés dans un ballon jaugé de 50 ml. Le volume est monté au trait en ajoutant un mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v). Ce ballon est appelé REF 200, car il constitue une solution de référence contenant environ 200 µg/ml de chaque matière active. Un second ballon jaugé de 50 ml est rempli avec 5 ml de chacune des solutions concentrées et monté au trait avec le même mélange d'acétonitrile et d'eau (REF 100). À partir de ces deux ballons, 10 dilutions sont réalisées. Ces dilutions sont résumées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Tableau de dilution des solutions de référence.

Solution finale	Volume de prélèvement (ml)	Solution prélevée	Volume final (ml)	Concentration finale (µg/ml)		
				Prochloraz	Triticonazole	Prothioconazole
REF 200	10	S°prochlo.	50	213,15	158,97	196,76
		S°triti.				
		S°prothio.				
REF 100	5	S°prochlo.	50	106,58	79,48	98,38
		S°triti.				
		S°prothio.				
REF 50	12,5	REF 200	50	53,29	39,74	49,19
REF 20	5	REF 200	50	21,32	15,90	19,68
REF 10	5	REF 100	50	10,66	7,95	9,84
REF 5	5	REF 50	50	5,33	3,97	4,92
REF 2	5	REF 20	50	2,13	1,59	1,97
REF 1	5	REF 10	50	1,07	0,79	0,98
REF 0,5	5	REF 5	50	0,53	0,40	0,49
REF 0,2	5	REF 2	50	0,21	0,16	0,20
REF 0,1	5	REF 1	50	0,11	0,08	0,10
REF 0,05	5	REF 0,5	50	0,05	0,04	0,05

Le tableau résume comment ont été réalisées les dilutions des solutions de référence. La solution finale est le nom donné à la solution de référence. Les solutions S°prochlo., S°triti. et S°prothio. sont les solutions concentrées pour le prochloraz, le triticonazole et le prothioconazole. Le volume de prélèvement est la quantité de liquide prélevée dans la « solution prélevée ». Un mélange d'acétonitrile et d'eau est ensuite ajouté pour obtenir le volume final indiqué. Les trois dernières colonnes donnent les concentrations en prochloraz, triticonazole et prothioconazole dans la solution finale.

### Extraction des substances actives

Une extraction assistée par ultrasons a permis d'extraire les trois substances actives des deux traitements, Kinto Duo et Redigo, présentes sur les semences. Pour ce faire, 50 ml d'un mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v) a été ajouté à 10 g de semences. L'extraction a été optimisée par une double immersion de 30 minutes dans un bain à ultrasons suivie de 10 minutes de repos. Pour vérifier qu'il n'y ait pas de composé dans le mélange d'acétonitrile et d'eau qui interfère avec la détermination des matières actives, un blanco est réalisé. Il contient également 50 ml du mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v), mais sans semence. De la même façon, un échantillon de semences de blé, un échantillon d'orge et un échantillon d'épeautre non traités sont soumis à l'extraction. Tout comme les échantillons de semences traitées, le blanco et les échantillons de semences non traitées seront soumis à la double immersion dans le bain à ultrasons.

L'extrait est ensuite filtré à l'aide d'un filtre pour seringue de 0,20 µm en nylon (Chromafil® PA, Macherey-Nagel) et mis en fiole pour l'UPLC. En attendant l'analyse, les fioles sont stockées au frigo à 4°C.

Pour valider la méthode, une seconde extraction est réalisée sur les semences. Si les extraits contiennent moins de 5 % de la dose mesurée lors de la première extraction, la méthode est validée. Pour ce faire, une fois la première extraction réalisée, les échantillons de 10 g de semences sont rincés avec deux fois 25 ml du mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v). 50 ml du mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v) sont ajoutés aux semences pour l'extraction. L'extraction est optimisée par une double immersion de 30 minutes dans un bain à ultrasons suivie de 10 minutes de repos. L'extrait obtenu est filtré de la même façon que pour la première extraction. Cette double extraction est réalisée pour chaque échantillon.

### Dosage des substances actives

Les échantillons sont placés dans le gestionnaire d'échantillons (deux plaques de 48 échantillons) où 4 µl seront prélevés par une aiguille et injectés dans une boucle d'injection de 10 µl.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Colonne : Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 100 mm
- Détecteur : détecteur UV à barrette de diodes
  - Détection à : 230 et 250 nm
  - Résolution : 1,2 nm
  - Nombre de points par seconde : 20 points/secondes
- Gradient de solvant
  - Solvant A1 : acétonitrile ULC/MS
  - Solvant B1 : eau ULC/MS
  - Débit : 0,50 ml/min

Tableau 10 : Gradient de solvants utilisé lors des analyses UPLC.

Temps (min)	% A	% B
0,00	35	65
0,05	35	65
4,00	95	5
5,00	95	5
5,10	35	65
6,00	35	65

% A = pourcentage du solvant acétonitrile; % B = Pourcentage d'eau.

- Solvant faible de rinçage : 600 µl eau ULC/MS
- Solvant fort de rinçage : 200 µl acétonitrile ULC/MS
- Température cible des échantillons : 20 °C
- Température cible de la colonne : 50 °C
- Volume injecté : 4 µl
- Mode d'injection : boucle partielle
- Durée d'une analyse : 6 min
- Durée totale des analyses : 2 jours, 18 heures, 58 secondes

- Pression :

**Tableau 11 : Pressions mesurées en début d'analyse UPLC.**

Date d'analyse	Pression (psi)	Delta (psi)
18/03/2015	9763	12
20/03/2015	9689	12
27/03/2015	9825	6

Pressions mesurées pour chaque jour d'analyse avant de lancer la séquence.

L'analyse a été réalisée en trois séquences. L'identification du prochloraz, prothioconazole et triticonazole a pu se faire en mesurant leur absorbance à différents temps de rétention (respectivement à 2,53, 2,34 et 1,94 min). Ces absorbances ont été mesurées à deux longueurs d'onde en fonction de la matière active à analyser. En effet, le prochloraz a une plus forte absorbance à 230 nm et le prothioconazole et le triticonazole à 250 nm. Une droite de calibration a été préalablement établie à l'aide de standards analytiques.

## 2.4. Mode opératoire pour l'analyse en dosage semence par semence

### Extraction des substances actives

Chaque semence est pesée et placée dans un tube eppendorf de 5 ml. Les matières actives, le prochloraz et le triticonazole, sont extraites en ajoutant 2 ml d'un mélange d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v). Dans le but d'optimiser l'extraction, les tubes Eppendorf sont plongés dans un bain à ultrasons deux fois 30 minutes, avec un temps de repos de 10 minutes pour éviter que l'eau ne chauffe trop. Pour les échantillons d'épeautre le temps d'extraction est doublé, c'est-à-dire quatre fois 30 minutes d'ultrasons, afin d'obtenir une extraction complète. Après homogénéisation, l'extrait est filtré sur du nylon 0,2  $\mu\text{m}$  et mis en fiole pour la chromatographie liquide à ultra performance. Comme pour le dosage moyen, un blanco et une semence de blé, d'orge et d'épeautre sont analysés de la même façon.

Les extraits sont stockés au frigo à 4 °C jusqu'à l'analyse.

### Dosage des substances actives

Les paramètres de la chromatographie liquide à ultra performance sont les mêmes que ceux utilisés pour le dosage moyen (Cf. 2.3.). Les analyses ont été réalisées en deux fois pour une durée totale de 2 jours, 12 heures, 23 minutes et 34 secondes. La pression au sein de la colonne est présentée dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12 : Pressions mesurées en début d'analyse UPLC.**

Date d'analyse	Pression (psi)	Delta (psi)
30/03/2015	9237	7
1/04/2015	9711	16

Pressions mesurées pour chaque jour d'analyse avant de lancer la séquence.

## 2.5. Calcul et expression des résultats

La première étape d'obtention des résultats en chromatographie est la détermination qualitative des matières actives dans les extraits. Celle-ci consiste à comparer les temps de rétention des matières actives (prochloraz, triticonazole et prothioconazole) détectées dans les extraits des échantillons avec les temps de rétention des solutions de référence. Une fois une ou plusieurs des matières actives détectées, l'étape suivante consiste en une analyse quantitative. Afin d'évaluer la teneur en matières actives détectée, la surface du pic de celle-ci est reportée sur une droite d'étalonnage. Pour une surface donnée, la droite donne la concentration en matières actives exprimée en  $\mu\text{g/ml}$ . Cette droite est construite à partir de la surface des pics des solutions de référence.

La teneur en matières actives obtenue est exprimée en g de matières actives par 100 kg de semences en tenant compte du facteur de dilution et du poids de la prise d'essai pour le dosage moyen ou du poids de la semence pour le dosage semence par semence :

$$\text{Teneur en matière active (g/100 kg de semences)} = \frac{C * \text{facteur de dilution}}{\text{poids}} \times 10$$

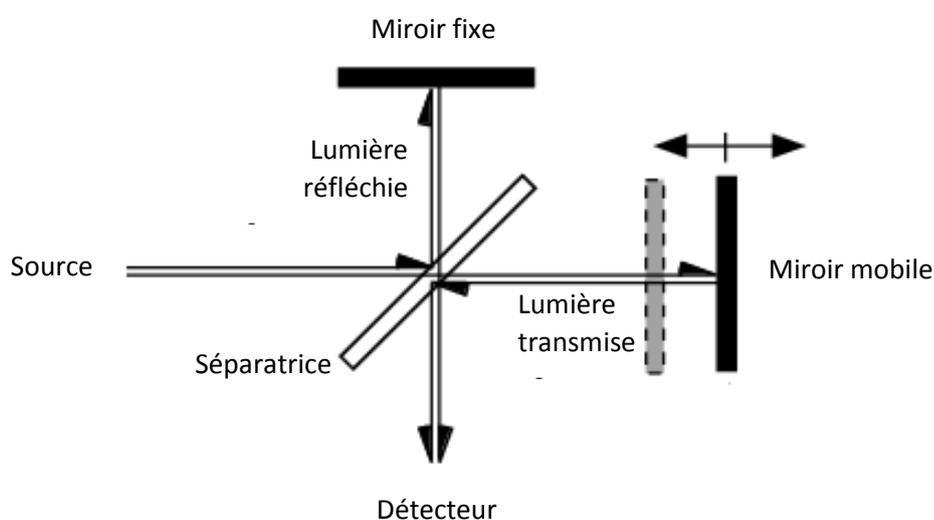
Avec C la concentration en matières actives obtenue par la droite de calibration, exprimée en  $\mu\text{g/ml}$ , un facteur de dilution de 50 et le poids de l'échantillon de semences analysées en g, le tout est multiplié par 10 pour passer de mg/kg de semences à des g/100 kg de semences.

### 3. ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE CLASSIQUE (BRUKER MPA)

#### 3.1. Appareillage

Le spectromètre proche infrarouge Bruker Multi Purpose FT-NIR Analyzer (Bruker MPA) est facilement utilisable et adapté aussi bien à l'analyse de solides que de liquides. Il est basé sur le principe de la transformée de Fourier (FT) et d'un détecteur qui mesure la lumière diffuse réfléchiée par la matière (réflexion diffuse) (Bruker Optics, 2012).

Le spectromètre à transformée de Fourier permet de moduler la radiation de la lumière incidente. L'interféromètre de Michelson est le cœur du spectromètre à transformée de Fourier. Comme l'illustre la **Figure 19**, la radiation incidente arrive sur une séparatrice en quartz, c'est-à-dire un miroir semi-transparent, qui sépare la lumière en deux. Une moitié de la lumière est réfléchiée et l'autre moitié transmise. La fraction du rayon réfléchiée frappe le miroir fixe, est réfléchiée vers la séparatrice puis transmise par la séparatrice vers le détecteur. La partie transmise par la séparatrice est réfléchiée par le miroir mobile puis par la séparatrice vers le détecteur. La lumière parcourt donc deux trajets différents à l'origine d'interférences constructives ou destructives en fonction de la position du miroir mobile. Lorsque les deux fractions du faisceau lumineux se recombinent, ils donnent lieu à un faisceau modulé qui est envoyé vers l'échantillon (Bertrand et Dufour, 2000; Saptari, 2003). La source lumineuse est une lampe à filament de tungstène et le détecteur utilisé est un détecteur en PbS de type semi-conducteur.



**Figure 19 : Interféromètre de Michelson.** La séparatrice sépare la lumière incidente en deux, une moitié est réfléchiée vers le miroir fixe puis transmise vers le détecteur, l'autre moitié est transmise vers le miroir mobile et réfléchiée par un miroir mobile avant d'être réfléchiée vers le détecteur (d'après Weisstein, 2007).

Pour effectuer une mesure avec le Bruker MPA, un récipient contenant l'échantillon est placé sur la fenêtre d'analyse (**Figure 20**). L'analyse dure 10 secondes. Pendant ce temps, l'appareil mesure 32 fois l'absorbance de l'échantillon à 700 longueurs d'onde dans une gamme spectrale allant de 1100 à 2500 nm par pas de 2 nm. En fonction du mode sélectionné, le récipient reste statique ou effectue un tour complet pour que les spectres soient pris à différents points. La résolution spectrale du Bruker MPA est de  $16\text{cm}^{-1}$ . L'ensemble des spectres obtenus par échantillon est moyenné en un spectre. Une fois l'analyse terminée la fraction de l'échantillon analysée est mise de côté et deux autres fractions sont analysées de façon similaire pour finalement avoir trois

spectres par échantillon. Entre chaque analyse la cellule est nettoyée avec un chiffon et un pinceau et un background est réalisé toutes les quatre heures. Le logiciel d'acquisition des données pour le Bruker MPA est Opus 7.2.

### **3.2. Mode opératoire pour l'analyse des formulations et des matières actives**

Après homogénéisation, une fraction de chaque formulation (Kinto Duo, Redigo et Beret Gold) est transférée dans des cuvettes en verre. Celles-ci sont déposées à tour de rôle sur la fenêtre d'analyse du Bruker MPA et analysées en mode réflectance statique en trois répétitions de 32 scans (**Figure 21 et 22**).

Les quantités de matières actives disponibles étant très petites, elles sont placées dans un réducteur inerte en aluminium afin d'analyser leur spectre moyen. L'analyse est réalisée en mode réflectance statique et 32 scans sont moyennés par spectre. Les analyses sont effectuées en triple (**Figure 23 et 24**).

### **3.3. Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen**

Pour les 85 échantillons, la cellule du Bruker MPA est remplie avec une partie de l'échantillon (**Figure 25 et 26**). L'analyse dure 30 secondes. Pendant ce temps, la cellule effectue un tour complet pour que les spectres soient pris à différents points de la cellule. L'ensemble des spectres obtenus est moyenné en un spectre moyen de l'échantillon. Une fois l'analyse terminée la fraction de l'échantillon analysée est mise de côté et deux autres fractions sont analysées de la même façon pour finalement avoir trois analyses et donc trois spectres par échantillon.

## 4. ANALYSE PAR IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE (BURGERMETRICS LINE SCAN)

### 4.1. Appareillage

Le Burgermetrics line scan est une caméra hyperspectrale proche infrarouge permettant de combiner l'imagerie à la spectroscopie proche infrarouge. Cette technologie fournit des données tridimensionnelles (x, y, z) : les deux premières coordonnées étant les données spatiales et la dernière la donnée spectrale, c'est-à-dire l'absorbance à différentes longueurs d'onde (**Figure 27**) (Cheng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Le système « line-scan » (ou « Push-broom ») utilisé a été développé par BurgerMetrics SIA (Riga, Latvia). Il est constitué d'une caméra hyperspectrale proche infrarouge (Specim Ltd, Oulu, Finland) combinée avec une bande transporteuse permettant ainsi l'acquisition d'images en continu et d'une source lumineuse constituée de deux spots de 150 watts. Le tout est relié à un ordinateur qui permet de piloter le système d'imagerie et d'acquérir les images hyperspectrales à l'aide du logiciel Hyperpro (**Figure 28**). Le détecteur de mercure/cadmium/tellure (MCT) du spectromètre est muni d'un système de refroidissement et d'un stabilisateur de température afin d'éviter une surchauffe. L'objectif microlens (microlentille) permet d'analyser des images de 10 cm de large avec une résolution spatiale de 300  $\mu\text{m}$ .

Le spectromètre balaye ligne après ligne l'objet se déplaçant de 0,5 à 100 mm/sec grâce à la bande transporteuse. L'image acquise est définie par une largeur, x, fixée à 320 pixels (10 cm) et une longueur, y, variant en fonction du nombre de lignes collectées. L'intensité de la lumière réfléchie par l'objet est mesurée à 209 longueurs d'onde dans une gamme allant de 1100 à 2400 nm par pas de 6,3 nm. Chaque spectre est la moyenne de 32 mesures (scans) (Fernandez *et al.*, 2014; Vermeulen *et al.*, 2012).

Le Burgermetrics line scan doit être allumé environ une heure avant le début des analyses pour que le système puisse se stabiliser. Lorsque l'appareil est stable, l'image est mise au point en passant un « étalon vitesse » à la caméra. L'image obtenue de la forme est analysée grâce à un fichier Excel, donnant la vitesse à utiliser en fonction des dimensions de l'étalon mesurées avec la caméra. Avant chaque série d'analyses, l'instrument est calibré en prenant une image dans le noir, c'est-à-dire lorsque la lentille de la caméra est obturée, et une image sur la céramique blanche afin de mesurer la réflectance minimale et maximale respectivement. Cette calibration est importante pour tenir compte des variations de réflectance, des variations de température de la source lumineuse et du manque d'uniformité de l'éclairage sur l'objet analysé (Vermeulen *et al.*, 2012). Une fois la calibration effectuée, une plaque en céramique est placée sous la caméra dans le but de détecter et de supprimer les pixels défectueux qui sont corrigés automatiquement. Ces trois étapes préliminaires effectuées, les analyses peuvent commencer.

### 4.2. Mode opératoire pour l'analyse des formulations

Pour acquérir le spectre des trois formulations Kinto Duo, Redigo et Beret Gold, une ligne de deux gouttes de chaque pesticide sont déposées à l'aide d'une pipette sur une plaque de céramique. La première goutte est laissée telle quelle afin d'obtenir des spectres d'une couche épaisse de produit alors que la seconde est étalée pour obtenir des spectres d'une couche plus fine de la formulation.

Les six lignes suivantes sont constituées chacune de six semences non traitées, respectivement de 2 variétés de blé (échantillons 82 et 83), d'orge (échantillons 80 et 81) et d'épeautre (échantillons 59 et 61). Les semences des deux premières colonnes ont été traitées au Kinto Duo, les deux suivantes au Rédigo et les deux dernières au Beret gold. Pour chaque formulation, la première semence est mise en contact avec le traitement par dépôt d'une goutte sur la semence, et la seconde semence par frottement de celle-ci dans une petite quantité de produit pour obtenir une couche moins épaisse de traitement sur (**Figure 29**).

L'acquisition de l'image de la plaque a été réalisée 3h après application des pesticides afin qu'ils aient séché, car l'eau absorbe fortement dans le proche infrarouge.

#### **4.3. Mode opératoire pour l'analyse en dosage moyen**

Afin de discriminer les différents types de pesticide appliqués sur les semences, huit semences par échantillon sont choisies et disposées en ligne sur le tapis (85 échantillons = 85 lignes) (**Figure 30**). Les échantillons et les semences sont choisis aléatoirement. Les semences de blé et d'orge qui présentent un sillon d'un côté de la semence, sont placées sur le tapis de façon à ce que quatre semences soient placées face sillon et quatre sur l'autre face.

Lors de cette analyse, la vitesse du tapis est réglée à 1,41 mm/sec.

#### **4.4. Mode opératoire pour l'analyse en dosage semence par semence**

Cette analyse a pour objectif l'évaluation de la qualité du traitement des semences en mesurant la concentration moyenne dans un lot ainsi que la répartition du traitement au sein des différentes semences de ce lot.

96 semences sont sélectionnées aléatoirement par échantillon et placées sur le tapis. La position de chaque semence étant importante pour les analyses futures en chromatographie liquide à ultra performance, celles-ci sont disposées en 12 lignes de huit semences bien espacées de façon à ce qu'elles ne se fassent pas d'ombre lors de l'acquisition d'images (**Figure 31**).

Lors de cette analyse, la vitesse du tapis est réglée à 1,29 mm/sec.

Après avoir été scannées par le Burgermetrics line scan, les semences sont minutieusement rangées une à une dans une microplaque à 96 puits pour les semences d'orge et de blé, et dans des tubes eppendorf de 2 ml pour l'épeautre trop imposant pour rentrer dans les trous de la plaque, en notant leur position sur le tapis.

Une fois l'analyse infrarouge terminée, le spectre moyen de chaque graine est calculé. Parmi les 96 spectres acquis par échantillon, 24 spectres sont sélectionnés, soit 24 semences, pour être analysées en chromatographie. Pour ce faire, la fonction Duplex de Matlab est appliquée aux matrices contenant les données des spectres. Cette fonction sélectionne les 24 spectres les plus représentatifs de la variabilité des spectres calculée pour chaque échantillon. Les six fois 24 semences traitées correspondant à ces spectres sont analysées par chromatographie liquide ultra performante.

## 5. MÉTHODOLOGIE ET TRAITEMENT DES DONNÉES

Le traitement des données spectrales est lié à l'utilisation simultanée des mathématiques, des statistiques et de l'informatique. Ces trois domaines sont rassemblés sous le terme de chimiométrie (Bertrand et Dufour, 2000). Les spectres acquis ont été convertis du format Hypersee au format Matlab en utilisant le logiciel de traitement de données Matlab version 7.5. (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Les modèles ont été développés en utilisant la boîte à outils PLS-toolbox version 7.0.2 (Eigenvector Research, Inc. 2012). Trois types de méthodes chimiométriques ont été appliquées dans le cadre de ce travail. L'exploration des données a été effectuée en utilisant l'analyse en composantes principales (PCA). Le développement de modèles de classification a été réalisé en utilisant l'analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels (PLSDA). Et enfin, Le développement de modèles d'étalonnage a été réalisé en utilisant la méthode des moindres carrés partiels (PLS) (Wise *et al.*, 2006).

L'idée centrale de l'analyse en composantes principales (PCA) est de décrire la variation dans un jeu de données multivariées au moyen d'un nombre réduit de variables non-corrélées. De nouvelles variables, appelées composantes principales, sont créées résumant au mieux la variabilité contenue dans les spectres. Pour chaque composante, un graphique peut être représenté, illustrant les loadings. Les loadings représentent le poids (score) accordé à chaque longueur d'onde. Ils permettent ainsi de voir les longueurs d'onde impliquées dans la discrimination. Cette méthode va permettre une analyse exploratoire des résultats afin de visualiser les différents regroupements d'échantillons en fonction des variations entre leurs spectres.

Les spectres infrarouges sont riches en informations. Ces informations peuvent être mises en relation avec des valeurs de référence par le biais d'un étalonnage. Cette relation se fait par l'intermédiaire d'une relation mathématique. La méthode permettant d'établir cette relation est la méthode des moindres carrés partiels (Pigeon, 2003). Ces méthodes ont pour but d'estimer le plus précisément possible des variables à partir des données mesurées. La méthode PLS associe l'analyse en composantes principales et la régression. Elle va également créer des composantes principales expliquant au mieux les variables, mais en tenant compte de la valeur de référence. La méthode des moindres carrés partiels va donc permettre d'établir des équations de calibration afin de prédire la teneur en matières actives. Cette méthode peut également être utilisée pour la discrimination. On parle alors de l'analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels (PLSDA).

### 5.1. Prétraitement des données spectrales

Des prétraitements peuvent être appliqués aux spectres dans le but de réduire les interférences telles que la taille de l'échantillon, les effets optiques et les variations de la ligne de base. Les traitements utilisés dans ce mémoire sont la normalisation et la dérivée. La déviation normale standardisée (SNV, standard normal variate) permet de corriger les variations d'intensité d'absorbance liées notamment à la forme des échantillons. Elle consiste à soustraire l'absorbance moyenne des spectres de chaque spectre avant de les diviser par leur écart-type. La dérivée transforme les spectres pour mettre en évidence les différences spectrales (Bertrand et Dufour, 2000). Elle est codifiée en trois nombres. Le premier représente l'intervalle de dérivation, le second le degré du polynôme et le troisième le degré de la dérivée (i.e. 1 pour la dérivée première). Ces prétraitements ont été choisis de façon à obtenir les meilleurs modèles.

## 5.2. Création de bibliothèques

Afin d'établir les différents modèles, des bibliothèques ont été construites. Pour le Bruker MPA, ces bibliothèques sont simplement constituées des spectres moyens résultant des 32 scans.

Les analyses effectuées sur le Brukermetrics line scan fournissent un spectre pour chaque pixel. Ce qui signifie qu'on a à la fois les spectres des échantillons, mais également les spectres du support sur lequel ils sont posés. Différentes bibliothèques ont donc été créées en fonction de l'objectif des analyses.

La bibliothèque contenant les données de l'analyse de la plaque de céramique est établie en sélectionnant manuellement sur l'image les zones correspondant aux différentes formulations en indiquant bien leur correspondance avec l'image. Pour les semences ayant reçu une goutte de pesticide ou ayant été frottées dedans, les spectres sont également sélectionnés manuellement uniquement sur les zones recouvertes de pesticides.

Pour les analyses en dosage moyen, afin de n'avoir dans la bibliothèque que les spectres moyens des semences, un masque est appliqué sur l'image. Ce masque consiste à retirer les spectres du support en ne laissant que les spectres des semences. Celles-ci sont numérotées automatiquement en fonction de leur position sur l'image. La **Figure 32** illustre l'image d'une ligne de 8 semences acquise par le Brukermetrics line scan après application du masque. Une fois les semences isolées, le spectre moyen de chaque semence est calculé. Les spectres moyens par semences sont rassemblés dans une bibliothèque.

Pour les analyses en semences par semences, le premier objectif est d'identifier les zones traitées des non traitées au sein d'une semence. Les images utilisées pour réaliser ces analyses sont les mêmes que pour le dosage moyen, mais cette fois, après avoir appliqué le masque, des zones bien traitées au sein même des semences ont été sélectionnées permettant ainsi d'avoir autant de spectres que de pixels sélectionnés. Pour les zones non traitées, les spectres sont sélectionnés sur les semences non traitées.

Le second objectif consiste à prédire la teneur en matières actives par semence. La bibliothèque est établie sur les 6 fois 96 semences traitées au Kinto Duo, selon le même principe que pour la bibliothèque établie pour le dosage moyen. Cette bibliothèque est donc constituée des spectres moyens par semences des 6 fois 96 semences.

## 5.3. Calibration – Validation croisée – Validation

Afin d'évaluer la performance des modèles, les échantillons, ou semences, sont séparés en un set de calibration et un set de validation. Le set de calibration est utilisé pour créer un modèle. Ce modèle est ensuite appliqué sur le set de validation afin d'évaluer s'il prédit correctement les données. Une validation croisée est également appliquée au set de calibration. La méthode de validation croisée appliquée est le « leave one out ». Elle consiste à isoler chaque échantillon consécutivement pour valider le modèle (Bertrand et Dufour, 2000).

Pour les analyses en dosage moyen et la prédiction de la teneur en matières actives en semence par semence, les échantillons de semences et les semences sont scindées de façon à avoir 80 % des échantillons dans le set de calibration et 20 % des échantillons dans le set de validation.

Pour les analyses de discrimination des zones non traitées en semence par semence, deux échantillons par traitement, et deux semences par échantillon ont été sélectionnés pour calibrer le

modèle. Nous avons dû nous limiter à deux semences par échantillon, car pour beaucoup d'échantillons il n'était pas possible de sélectionner une grande zone traitée sur les semences, le traitement sur la semence étant très hétérogène. Pour certains échantillons les semences étaient tellement mal traitées qu'une seule semence par échantillon n'a pu être prise ou bien si les zones de traitement étaient petites par rapport à la taille de la semence, une semence en plus a été incluse dans le set de calibration. Aussi, pour les traitements dont nous disposons que d'un échantillon, quatre semences au lieu de deux ont été sélectionnées. Enfin, pour les semences non traitées, quatre semences par échantillon et deux échantillons par espèce ont été sélectionnées. Pour cette section, la validation sur le reste des semences a été visuelle puisque nous ne disposons pas d'autre moyen d'identifier les zones non traitées.

#### 5.4. Modèles de discrimination

L'évaluation des modèles de discrimination (PLSDA) se fait par l'analyse des matrices de confusion de la calibration, de la validation croisée et de la validation. La matrice de confusion donne pour les différentes classes à discriminer, le nombre d'échantillons provenant de la classe étudiée et que le modèle prédit comme tel, c'est-à-dire la sensibilité du modèle (TP, true positive), le nombre d'échantillons ne provenant pas de la classe étudiée, mais prédit comme y appartenant (FP, False positive), le nombre d'échantillons provenant de la classe étudiée, mais n'étant pas prédit par le modèle (FN, false negative) et le nombre d'échantillons ne provenant pas de la classe étudiée et prédit comme tel par le modèle (TN, true negative) (**Tableau 13**). Un modèle est parfaitement capable de prédire les données lorsque les coefficients TP et TN sont de 100 % pour la calibration, la validation croisée et la validation externe. Aussi il est important que les matrices de confusion du set de calibration et de la validation croisée soient similaires. Un écart important entre les deux indique que le modèle établi n'est pas bon.

Tableau 13 : Matrice de confusion.

		Classes réelles	
		Positif	Négatif
Classes prédites	Positif	TP	FP
	Négatif	FN	TN

TP = vrais positifs (true positive) ; FP = faux positifs (false positive) ; FN = faux négatifs (false negative) ; TN = vrais négatifs (true negative).

#### 5.5. Équations d'étalonnage

L'étalonnage, ou calibration, consiste à relier les données spectrales aux valeurs de référence par une relation mathématique. La régression utilisée pour réaliser la calibration est la régression des moindres carrés partiels (PLS, partial least square). Cette régression cherche des variables latentes, tenant compte à la fois des x (absorbances à différentes longueurs d'onde) et des y (valeurs de référence), permettant de prédire les valeurs de y. Par conséquent, les variables latentes sont des combinaisons linéaires des x fortement reliées à y (Bertrand et Dufour, 2000).

##### Résultats statistiques des analyses

Différents paramètres peuvent être utilisés pour évaluer la qualité des équations.

Le premier est l'erreur quadratique moyenne de calibration (RMSEC, root mean square error of calibration). Elle est obtenue à partir du set de calibration et est définie comme :

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c - p - 1}}$$

Avec  $y_i$  la valeur mesurée par la méthode de référence pour l'échantillon  $i$ ,  $\hat{y}_i$  la valeur prédite par la méthode de spectroscopie proche infrarouge,  $n_c$  le nombre d'échantillons utilisés pour la calibration et  $p$  le nombre de termes dans le modèle. La RMSEC correspond à la différence entre les valeurs de référence et les valeurs en spectroscopie infrarouge du spectre de calibration. Ce paramètre tient compte du nombre de variables latentes incluses dans le modèle. En effet, le RMSEC diminue lorsque le nombre de variables latentes augmente dans l'équation. Aussi, plus la RMSEC est faible, meilleure est l'équation de calibration (Burns et Ciurczak, 2007).

Le second paramètre est l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV, root mean square error of cross validation). Elle est obtenue à partir du set de calibration et est mesurée comme :

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c - p - 1}}$$

La RMSECV représente la racine carrée de la moyenne des écarts entre la valeur de référence et la valeur prédite par la spectroscopie infrarouge pour le set de calibration.

Le troisième est l'erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP, root mean square error of prediction). La RMSEP est obtenue à partir du set de validation de  $n_v$  échantillons et est définie comme :

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}}$$

La RMSEP représente la racine carrée de la moyenne des écarts entre la valeur de référence et la valeur prédite par la spectroscopie infrarouge pour un sous ensemble d'échantillons présentant les mêmes caractéristiques que le set de calibration, mais n'ayant pas participé à la conception de l'équation de calibration. Un bon étalonnage résulte en un RMSEP proche du RMSEC.

Le quatrième est le RPD<sub>cv</sub> (Ratio of prediction to deviation). Il représente le rapport entre l'écart-type des valeurs (SD) et l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV). La valeur du RPD<sub>cv</sub> permet d'évaluer l'efficacité de l'analyse infrarouge. Un RPD inférieur à 1 signifie que le modèle de calibration n'est pas capable de prédire les valeurs de référence. Plus la valeur du RPD augmente, meilleur est la qualité de la prédiction. La valeur du RPD représente le nombre de classes pouvant être séparée par le modèle. En effet, un modèle dont le RPD est égal à 3 permet de séparer les données en trois groupes. Dans notre cas, un RPD de 3 est satisfaisant puisqu'il permet de séparer les échantillons analysés bien dosés des sous-dosés et des surdosés. Afin de réaliser une analyse quantitative à partir du modèle établi, il faut que le RPD soit d'au moins 5 (Williams, 2014).

Le dernier paramètre est le coefficient de détermination ( $R^2$ ). Il est défini comme :

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

Avec  $\bar{y}$  la valeur moyenne mesurée sur l'ensemble des échantillons. Le  $R^2$  représente la proportion de la variance par le modèle (Pigeon, 2003; Vandeginste, 1998; Zhang et al., 2004).

## IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

L'analyse des résultats est divisée en deux parties. La première regroupe l'ensemble des résultats obtenus par la chromatographie liquide à ultra performance. C'est-à-dire les dosages moyens et en semence par semence effectués sur les échantillons de semences. La seconde partie est constituée des résultats issus de la spectroscopie proche infrarouge. On retrouve dans celle-ci l'analyse des spectres des formulations et des matières actives, ainsi que les analyses effectuées en dosage moyen et en semence par semence.

### 1. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À ULTRA PERFORMANCE

#### 1.1. Validation de la méthode d'analyse

Afin de s'assurer que les matières actives sont bien extraites et que les résultats obtenus sont spécifiques et répétables, la méthode doit être validée.

L'extraction des matières actives est une étape critique de la méthode d'analyse. Pour vérifier l'efficacité de l'extraction, une seconde extraction est réalisée sur les semences traitées. Les résultats obtenus montrent que les teneurs en matières actives dans la seconde extraction sont toujours inférieures à 5 % des teneurs de la première extraction, pour chaque échantillon. L'extraction est évaluée juste.

La spécificité des résultats est validée en confirmant l'identité des trois matières actives (prochloraz, triticonazole et prothioconazole) par l'analyse chromatographique (UPLC) des échantillons de référence de prochloraz, triticonazole et prothioconazole purs dans la solution d'acétonitrile et d'eau 80/20 (v/v). L'analyse du blanco et des extraits issus des échantillons de blé, d'orge et d'épeautre non traités a permis de vérifier l'absence de composé susceptible d'interférer avec la détermination des matières actives dans les solutions de référence et dans les échantillons de semences traitées. Ces analyses ont permis de montrer la pureté spectrale et de certifier l'identité de chaque matière active.

La répétabilité (ISO, 1994) des injections est vérifiée en réalisant successivement six injections des solutions de référence. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 14**.

La linéarité de la réponse du détecteur a pu être démontrée pour les trois matières actives dans une certaine gamme de concentrations. Cette gamme de concentrations va de 0,05 à 213 µg/ml pour le prochloraz, de 0,04 à 159 µg/ml pour le triticonazole et de 0,05 à 197 µg/ml pour le prothioconazole. Une régression linéaire a été calculée pour chaque matière active en mesurant la surface du pic concerné de solutions de référence de concentrations connues. Ces concentrations sont reprises dans le **Tableau 15**.

Les limites de détection ( $L_D$ ) et de quantification ( $L_Q$ ) sont toutes deux estimées à partir du bruit de fond (ligne de base). Elles correspondent respectivement à trois et dix fois la hauteur du bruit de fond (Thompson, 2002). La limite de détection est de 0,10 g / 100 kg et la limite de quantification de 0,35 g/100 kg pour le prochloraz et de 0,12 g/100 kg et 0,40 g/100 kg pour le triticonazole et le prothioconazole.

Ces résultats montrent que la méthode d'analyse pour le prochloraz, le triticonazole et le prothioconazole est spécifique, linéaire et suffisamment sensible pour les doses cibles concernées (dose cible de 12 g / 100 kg pour le prochloraz, 4 g / 100 kg pour le triticonazole et 10 g / 100 kg pour le prothioconazole et que les injections sont répétables.

## 1.2. Résultat

Les résultats des analyses chromatographiques sont présentés dans l'**Annexe 1** pour le dosage moyen et dans l'**Annexe 2** pour le dosage semence par semence. Chaque résultat découle de la moyenne des surfaces de deux injections.

### Dosage moyen

Sur base des résultats chromatographiques obtenus en mesurant les teneurs moyennes en matières actives des échantillons de blé, d'orge et d'épeautre traités avec les formulations Kinto Duo ou Redigo, 16 échantillons mal étiquetés sont détectés. En effet, 15 échantillons signalés comme ayant été traités avec du Kinto Duo et un échantillon indiqué comme traité avec du Redigo s'avèrent non traités avec le traitement indiqué. En effet, dans certains échantillons indiqués comme traités avec la formulation Kinto Duo, on retrouve un pic de prothioconazole. Hors celui-ci ne rentre pas dans la formulation du Kinto Duo. Dans d'autres échantillons indiqués comme traités au Kinto Duo, on ne retrouve pas le pic de prochloraz ou de triticonazole. D'autres encore présentent une des matières actives du Kinto Duo et la matière active du Redigo. Dans l'échantillon injustement identifié comme traité au Redigo, on trouve les pics correspondant à la présence de prochloraz et triticonazole (matières actives du Kinto Duo) en plus du pic du prothioconazole (matière active du Redigo). Ces échantillons ont donc été écartés du traitement de données concernant les matières actives ou les traitements pesticides.

Les distributions des teneurs moyennes en substances actives sont illustrées dans les **Figures 33 et 34**. Le **Tableau 16** résume les résultats. Ces teneurs sont regroupées par classe de 10 % autour de la dose cible, 100 % correspondant à la dose cible en matières actives.

**Tableau 16 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance.**

Formulation	Matière active	n	% Dose cible				CV	% Echantillons		
			Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	±30%
Kinto Duo	Prochloraz	11	119,91	68,02	4	248	56,73	27,27	36,36	63,64
	Triticonazole	11	152,00	72,09	66	305	47,43	9,09	54,54	63,64
	Prochloraz + Triticonazole	11	128,00	67,00	19	246	52,22	18,18	36,36	54,55
Redigo	Prothioconazole	21	56,09	23,06	24	137	41,11	90,48	4,76	95,24

Le tableau résume pour chaque traitement (Kinto Duo et Redigo) les résultats des teneurs moyennes en matières actives obtenus sur l'ensemble des échantillons. Les résultats sont donnés indépendamment pour chaque matière active puis, pour le Kinto Duo, en sommant les deux matières actives (prochloraz et triticonazole). La dose cible du prochloraz est de 12 g/100 kg, de 4 g/100 kg pour le triticonazole (16 g/100 kg pour la somme des deux) et de 10 g/100 kg pour le prothioconazole. n = nombre d'échantillons ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; CV = coefficient de variation ; < 30 % = pourcentage des échantillons sous-dosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est inférieure à 30 % en dessous de la dose cible ; > 30 % = pourcentage des échantillons surdosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est supérieure à 30 % au-dessus de la dose cible ; +/- 30 % = pourcentage des échantillons mal dosés, c'est-à-dire la somme des échantillons sous et surdosés. Les valeurs des Moy, SD, min et max sont exprimées en pourcentage de la dose cible (100 % correspondant à la dose cible). < 30 %, > 30 % et ± 30 % sont exprimées en pourcentage d'échantillons.

La **Figure 33** représente la distribution des teneurs moyennes en prochloraz et triticonazole pour les 11 échantillons de blé, d'orge et d'épeautre traités avec la formulation Kinto Duo. Ce graphique montre que les distributions des deux matières actives de la formulation Kinto Duo sont comparables. Néanmoins, ces distributions ne suivent pas une distribution normale. Pour le prochloraz la moyenne se situe à 119,91 % avec un écart type de 68,02 %. Pour le triticonazole la moyenne est encore plus éloignée de la dose cible puisqu'elle se situe à 152,00 % avec un écart

type de 72,09 %. En sommant les deux matières actives, on constate que 54,55 % des échantillons sont mal dosés selon la norme du PSD (Pesticide Safety Directorate). Parmi ces échantillons, la majorité est surdosée, certains étant traités avec plus de deux fois la dose cible.

Les résultats de la distribution de la matière active, prothioconazole, du produit formulé Redigo se rapprochent du profil d'une distribution normale comme l'illustre la **Figure 34**. L'écart-type de 23,06 % est moins élevé comparé à ceux des matières actives du Kinto Duo de (67 % pour les deux matières actives). On peut constater qu'un seul des 21 échantillons a une teneur en prothioconazole dans la tranche de 30 % autour de la dose cible. En effet, 90,48 % des échantillons traités au Redigo sont sous-dosés. C'est ce qui explique que la moyenne de 56,09 % est nettement inférieure à la dose cible.

### Dosage semence par semence

Le **Tableau 17 (A et B)** résume les résultats chromatographiques pour les 6 échantillons de 24 semences traitées au Kinto Duo. Pour chaque échantillon, le tableau reprend le nombre de semences analysées par lot, la valeur moyenne mesurée, l'écart-type, le minimum, le maximum et le coefficient de variation. Il reprend également le pourcentage des semences sous-dosées et surdosées selon la norme du PSD.

**Tableau 17 A : Teneurs moyennes en matières actives par espèce de semences mesurées par chromatographie liquide ultra à performance.**

Espèce	N°	Matière active	n	% Dose cible				CV	% Echantillons		
				Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	±30%
Blé	20	Prochloraz	24	82,6	28,5	35,2	149,5	34,6	41,7	4,2	45,8
Blé	20	Triticonazole	24	98,8	36,2	37,6	187,7	36,7	20,8	20,8	16,7
Blé	20	Prochloraz + Triticonazole	24	86,6	30,3	35,8	159,0	37,6	33,3	4,2	37,5
Blé	51	Prochloraz	24	232,6	142,8	140,0	768,5	61,4	0,0	100,0	100,0
Blé	51	Triticonazole	24	261,1	161,7	155,0	877,3	61,9	0,0	100,0	100,0
Blé	51	Prochloraz + Triticonazole	24	239,7	147,5	143,7	795,7	61,5	0,0	100,0	100,0
Orge	74	Prochloraz	24	48,6	29,3	23,7	144,3	60,3	83,3	4,2	87,5
Orge	74	Triticonazole	24	52,4	34,3	21,0	163,7	65,6	83,3	4,2	87,5
Orge	74	Prochloraz + Triticonazole	24	49,6	30,5	23,1	149,2	61,6	83,3	4,2	87,5
Orge	75	Prochloraz	24	51,9	26,5	20,9	100,5	51,0	75,0	0,0	75,0
Orge	75	Triticonazole	24	65,0	31,0	25,2	127,4	47,7	62,5	0,0	62,5
Orge	75	Prochloraz + Triticonazole	24	55,2	27,5	22,0	107,2	50,0	70,9	0,0	70,9

**Tableau 17 B : Teneurs moyennes en matières actives par espèce de semences mesurées par chromatographie liquide ultra à performance.**

Espèce	N°	Matière active	n	% Dose cible				CV	% Echantillons		
				Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	±30%
Epeautre	57	Prochloraz	24	136,6	177,2	31,9	705,3	129,7	58,3	16,7	75,0
Epeautre	57	Triticonazole	24	165,3	202,1	51,2	815,1	122,3	25,0	20,8	45,8
Epeautre	57	Prochloraz + Triticonazole	24	143,8	183,4	41,3	732,8	127,6	45,8	16,7	62,5
Epeautre	58	Prochloraz	24	203,8	203,0	46,8	822,4	99,6	12,5	41,7	54,2
Epeautre	58	Triticonazole	24	240,1	230,4	60,0	938,9	96,0	8,3	58,3	66,7
Epeautre	58	Prochloraz + Triticonazole	24	212,9	209,9	50,6	851,2	98,6	8,3	45,8	54,7

Le tableau résume pour chaque échantillon les résultats des teneurs en matières actives obtenus sur l'ensemble des semences de l'échantillon. Les résultats sont donnés indépendamment pour chaque matière active puis en sommant les deux matières actives (prochloraz et triticonazole). La dose cible du prochloraz est de 12 g/100 kg, de 4 g/100 kg pour le triticonazole et de 16 g/100 kg pour la somme des deux matières actives. n = nombre de semences ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; CV = coefficient de variation ; < 30 % = pourcentage des semences sous-dosés, c'est-à-dire dont la teneur moyenne en matières actives est inférieure à 30 % en dessous de la dose cible ; > 30 % = pourcentage des semences surdosées, c'est-à-dire dont la teneur moyenne en matières actives est supérieure à 30 % au-dessus de la dose cible ; +/- 30 % = pourcentage des semences mal dosées, c'est-à-dire la somme des semences sous et surdosées. Les valeurs des Moy, SD, min et max sont exprimées en pourcentage de la dose cible (100 % correspondant à la dose cible). < 30 %, > 30 % et ± 30 % sont exprimées en pourcentage d'échantillons.

Les **Figures 35, 36 et 37** illustrent les résultats chromatographiques des teneurs en prochloraz et en triticonazole sur 24 semences pour un échantillon d'épeautre de blé et d'orge. Le prochloraz et le triticonazole sont les matières actives de la formulation Kinto Duo.

L'échantillon de blé n°20 est le seul échantillon pour lequel plus de 50 % des semences ont une teneur en matières actives comprise autour des 30 % de la dose cible autorisée. La distribution des semences de cet échantillon est représentée sur la **Figure 36**. Cet échantillon a le coefficient de variation (37,6 %) le moins élevé pour l'ensemble des deux matières actives du Kinto Duo. Pour le prochloraz et le triticonazole rassemblés, les teneurs varient entre 35,8 % et 159,0 % de la dose cible. C'est aussi le seul échantillon dont les moyennes sont comprises dans les 30 % autour de la dose cible, avec néanmoins des écarts-types compris entre 28,5 % et 36,2 %.

Le second échantillon de blé (n°51) a une teneur moyenne en matières actives beaucoup plus élevée que l'échantillon n°20. En effet, sa teneur moyenne en matières actives est le double de la dose cible avec des teneurs allant jusqu'à 877,34 % de la dose cible pour le triticonazole. Dans cet échantillon, 100 % des semences sont surdosées.

La distribution de l'échantillon n° 74 d'orge est illustrée sur la **Figure 37**. Il a une teneur en matières actives totale de 49,6 %. Les teneurs pour l'ensemble des matières actives varient de 23,1 % à 149,2 %. Pour cet échantillon, seulement 12,5 % des semences sont bien dosées. En effet, 4,2 % sont surdosées et 83,3 % sont sous-dosées.

L'échantillon d'orge n° 75 a des teneurs en matières actives similaires à celles de l'échantillon n° 74 d'orge, avec 75,0 % des échantillons sous-dosés pour le prochloraz, 62,5 % pour le triticonazole et 70,9 % pour les deux matières actives réunies.

Les semences d'épeautre sont celles qui atteignent les teneurs en matières actives les plus élevées.

La distribution des semences de l'échantillon n° 57 d'épeautre est présentée dans la **Figure 35**. Les moyennes et les écarts-types des différentes matières actives sont très élevés. Cet échantillon est celui pour lequel le coefficient de variation est le plus grand. Pour le prochloraz, par exemple, il est de 129,7 %. On observe en effet des teneurs en matières actives variant de 31,9 % à 705,3 % pour le prochloraz et de 51,2 % à 815,1 % pour le triticonazole, ce qui entraîne qu'au total 45,8 % des semences sont sous traitées et 16,7 % sont sur traitées.

L'échantillon d'épeautre n° 58 est celui pour lequel les écarts-types sont les plus importants. On observe plus de la moitié des semences surdosées avec des teneurs en prochloraz pouvant atteindre 822,38 % de la dose cible et 938,9 % pour le triticonazole. On trouve également 8,3 % des semences sous-dosées dans le lot pour les matières actives totales. C'est pourquoi les écarts-types et les moyennes sont si élevés.

Le traitement des semences étant un traitement de surface, la teneur en matières actives devrait croître avec la taille et donc le poids de la semence. La **Figure 38** présente la teneur en matières actives (prochloraz et triticonazole) sur les semences de l'échantillon 74 d'orge en fonction du poids des semences. On constate, contrairement à ce qu'on aurait pu croire, qu'il n'y a pas de corrélation entre la teneur en matières actives et le poids de la semence. Cette observation confirme l'hétérogénéité du traitement des semences puisque si le traitement était homogène la répartition de la matière active serait liée au poids de la semence.

### 1.3. Discussion

Les résultats d'analyse chromatographique des teneurs moyennes en matières actives dans les échantillons révèlent que le traitement des semences est très irrégulier d'un lot à l'autre. Contrairement à ce qu'on pourrait attendre, la moyenne des teneurs en matières actives des échantillons ne correspond pas à la dose cible visée. Pour le traitement Kinto Duo on observe un surdosage pouvant aller jusqu'à trois fois la valeur de la dose cible. Inversement pour la formulation Redigo, plus de 95 % des échantillons sont sous-dosés. Ces résultats coïncident avec ceux d'une enquête réalisée au Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W) (Pigeon, 2003). Dans cette enquête des échantillons de blé et d'orge traités avec différentes formulations ont été analysés afin de mesurer les teneurs moyennes en matières actives de chacun d'eux. Il est observé qu'en moyenne 70 % des échantillons présentent des teneurs moyennes en matières actives inférieures à la dose cible. Il est également constaté des surdosages pouvant être importants dans les 30 % restants.

Les résultats obtenus sur le dosage semence par semence vont dans le même sens. On observe pour les semences d'orge et d'épeautre respectivement plus de 87 % et 75 % de semences sous-dosées. De plus, dans les mêmes lots on trouve des surdosages importants. Pour l'épeautre une semence a été mesurée comme ayant sept fois la dose cible en prochloraz et huit fois la dose cible en triticonazole. L'échantillon de blé, malgré que les teneurs en matières actives soient centrées sur les doses cibles, de grands écarts sont mesurés entre les teneurs individuelles, et ce sur les trois espèces de semences. Le sous-dosage des semences d'orge et d'épeautre par rapport aux semences de blé s'explique par la différence de configuration entre les espèces. En effet, les semences de blé sont nues, alors que les semences d'orge et d'épeautre sont entourées de glumes. Lors du traitement des semences, des débris, morceaux de glumes peuvent se détacher et tomber, entraînant avec eux une partie du produit de traitement des semences (Pigeon, 2003).

Selon le PSD (Pesticide Safety Directorate, 2000) pour qu'une formulation de traitement des semences soit homologuée, il faut que la dose moyenne dans un lot de semences soit au minimum de 70 % de la dose cible et qu'au sein d'un lot les écarts entre les semences individuelles soient de maximum 25 %. D'après les résultats obtenus par nos analyses et l'enquête réalisée par O. Pigeon (2003), ces critères ne sont pas correctement appliqués. En effet, plus de la moitié des échantillons

analysés ne satisfont pas la norme. Lors de l'analyse des teneurs moyennes par échantillon, plus de 54 % des échantillons traités au Kinto Duo et 95 % traités au Redigo sont situés au-delà des limites de la recommandation. Les échantillons de blé et d'orge sont ceux pour lesquels le plus de semences sont mal dosées, pouvant aller jusqu'à 100 % de semences mal dosées pour l'échantillon de blé n° 51 et 87,5 % pour l'échantillon 74 d'orge. De plus, nous observons des variations nettement supérieures aux 25 % préconisés. Les écarts-types les plus élevés sont observés sur les semences d'épeautre, pouvant atteindre les 129 %. Les traitements sont donc hétérogènes. Cette hétérogénéité entraîne que la valeur moyenne mesurée pour l'ensemble d'un lot n'est pas exactement la même que la moyenne des 24 semences du même lot. Néanmoins lorsque la teneur moyenne indique un sous-dosage, la même conclusion est tirée de la moyenne des 24 semences. Pour expliquer cette hétérogénéité, plusieurs hypothèses ont été soumises par O. Pigeon (2003) : l'utilisation de produits dont la qualité est médiocre (mauvaise adhésivité), une homogénéisation incomplète du traitement, un instrument mal calibré.

## 2. ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE

### 2.1. Spectres des formulations, des matières actives et des semences traitées

Cette section présente les caractéristiques spectrales des formulations, des matières actives et des semences traitées acquises d'une part par la spectroscopie proche infrarouge classique et d'autre part par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge.

#### 2.1.1. Résultats

L'analyse visuelle des spectres est une première façon de voir dans quelles gammes de longueurs d'onde répondent les produits formulés, purs ou appliqués sur des semences, ainsi que leurs matières actives. L'identification de ces longueurs d'onde peut être utile lors de l'étape d'étalonnage. En effet, des modèles établis sur l'ensemble des longueurs d'onde pourront être comparés à des modèles construits sur une gamme réduite de longueurs d'onde. La caractérisation des spectres se fait d'une part par la spectroscopie proche infrarouge classique (SPIR) et d'autre part par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge.

#### Caractéristiques spectrales par SPIR

##### Analyse des spectres des formulations et des matières actives obtenus par Bruker MPA

La **Figure 39** compare les spectres obtenus à partir du Bruker MPA des formulations Kinto Duo, Redigo et Beret Gold aux matières actives prochloraz et prothioconazole ainsi qu'aux semences de blé non traitées et traitées avec ces trois formulations. Ces spectres sont présentés en fonction de la longueur d'onde, exprimée en nm, et de l'absorbance, exprimée en logarithme de l'inverse de la réflectance ( $\log 1/R$ ). Le prochloraz est une des deux matières actives constitutives de la formulation Kinto Duo et le prothioconazole la matière active du Redigo. Les spectres des matières actives présentent une absorbance plus faible que les formulations. Cette baisse d'intensité s'explique par la différence d'état entre les formulations et les matières actives. En effet, les formulations sont sous forme liquide contrairement aux matières actives disponibles sous forme de poudre. L'utilisation d'un réducteur pour l'analyse des matières actives poudreuses entraîne également une modification de l'absorbance. Ce type de réducteur ne modifie en rien les pics observés, mais entraîne une baisse d'intensité de l'absorbance mesurée. Cette variation d'intensité entre les spectres peut être corrigée par un prétraitement des spectres en utilisant la déviation standard normale (SNV). Une dérivée est ensuite appliquée pour mettre en évidence les différences spectrales. Les spectres prétraités sont représentés dans la **Figure 40**.

Ces figures montrent que les trois types de spectres (formulations pures, semences de blé et matières actives) présentent des profils spectraux différents. Le profil spectral des semences de blé traitées et non traitées sont similaires. Par conséquent, les pics principaux sont caractéristiques de la composition des graines de céréales. On trouve par exemple à 1450 nm et 1940 des pics correspondant respectivement à l'élongation des liaisons O-H pour 1450 nm et à leur élongation et déformation à 1940. Ces pics sont caractéristiques de la présence d'eau. On trouve également entre 2000 et 2200 nm un pic englobant des pics caractéristiques de l'amidon, des acides aminés et des protéines (Osborne, 1986). Les différences entre les semences de blé traitées et non traitées ne sont pas visibles sur le spectre non prétraité. On voit cependant une différence sur les spectres prétraités entre 2200 et 2300 nm. Les spectres des formulations pures Kinto Duo, Redigo et Beret Gold présentent également une allure similaire. En effet, chez chacune de ces formulations on trouve deux pics volumineux : le premier à 1450 nm correspondant à la première harmonique des bandes d'élongation du lien O-H de l'eau et le second à 1940 nm correspond à l'élongation et à la

déformation de la liaison O-H de l'eau. Ces pics sont caractéristiques de la présence d'eau, c'est pourquoi ils ne sont pas marqués dans les spectres des matières qui sont sous forme solide et moins marqués pour les semences de blé qui contiennent environ 14 % d'eau. On voit cependant des différences entre les spectres des produits formulés dans les zones où les pics des profils spectraux des matières actives sont fortement marqués.

Les pics caractéristiques de la structure chimique des matières actives se situent entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm. Ces bandes spectrales sont caractéristiques des groupements moléculaires des matières actives.

Les spectres moyennés sur les trois répétitions des échantillons traités et non traités regroupés en fonction du groupe de formulations acquis avec le Bruker MPA sont représentés dans la **Figure 41**. Les profils spectraux sont semblables et aussi bien les trois groupes traités que les semences non traitées se chevauchent. On voit cependant trois regroupements de spectres en fonction de l'intensité de leur absorbance. Ces rassemblements correspondent aux trois classes d'espèces, avec en partant du haut le blé, l'orge et enfin l'épeautre avec l'absorbance la moins élevée.

### Caractéristiques spectrales par imagerie hyperspectrale proche infrarouge

L'analyse sur le Burgermetrics line scan de la plaque de céramique a permis d'acquérir différents profils spectraux.

En comparant les spectres moyens des formulations pures disposées en couche épaisse et fine sur la céramique, on constate que l'intensité de l'absorption des formulations en couche fine est faible due à la réflexion presque totale de la lumière par la céramique. L'allure des spectres de la semence sur laquelle une goutte de formulation a été déposée et celle qui a été frottée dans une petite quantité de formulation sont fort semblables. Ce sont donc les spectres des semences frottées dans le produit qui seront utilisés car ils sont plus représentatifs des semences traitées, puisque ces semences présentent une couche moins épaisse de formulation à leur surface. On ne distingue pas non plus de différence spectrale entre les deux variétés de chaque espèce traitée.

La **Figure 42** reprend donc les spectres des formulations de Kinto Duo, Redigo et Beret Gold posées en goutte sur la céramique et frottées sur des semences de blé ainsi que le spectre d'une semence de blé non traitée. On distingue facilement trois groupes. A savoir, la semence de blé non traitée qui a une absorbance plus élevée, les semences de blé frottées avec les formulations et les formulations pures. Ces dernières présentent un spectre distinct par rapport aux semences de blé traitées et non traitées qui, hormis une différence d'intensité d'absorbance, ont des spectres aux allures similaires.

Les pics caractéristiques de l'eau sont moins marqués pour les spectres des formulations pures issus du Burgermetrics line scan par rapport au spectre acquis avec le Bruker MPA puisque les formulations ont été séchées avant d'être analysées avec le Burgermetrics line scan. Dès lors on découvre d'autres pics qui pourront servir à discriminer les différentes formulations. On observe notamment un pic à 1671 nm pour les formulations Redigo et Kinto Duo qui n'est pas présent dans le Beret gold. Ce pic correspond à un groupe aromatique lié à un groupement CH (Osborne, 1986). Ce groupe est effectivement présent dans la formule de la matière active du prothioconazole (matière active du Redigo) et dans le triticonazole (matières actives du Kinto Duo), mais pas dans le fludioxonil (Beret Gold).

Les spectres moyens des 8 spectres des échantillons de chaque groupe de semences non traitées acquis par le Burgermetrics line scan sont représentés dans la **Figure 43**. Comme pour les spectres issus du Bruker MPA, les profils spectraux des différents échantillons sont semblables. On ne distingue pas les groupes de formulations. Cependant la séparation entre les trois classes d'espèces est plus marquée que pour le Bruker MPA.

### 2.1.2. Discussion

Les spectres acquis par le Bruker MPA et le Burgermetrics line scan sont similaires. En effet, pour un même échantillon le profil spectral est le même pour les deux instruments. On observe cependant des variations dans l'intensité de l'absorbance. Les spectres acquis avec le Bruker MPA présentent des absorbances plus intenses que ceux acquis avec le Burgermetrics line scan.

L'analyse visuelle des spectres moyens des formulations, des matières actives et des semences traitées, permet de détecter la présence de zones variant d'une formulation à l'autre. Ces variations s'expliquent entre autres par la présence de pics caractéristiques de la structure chimique des matières actives. Cependant, la composition des formulations étant secrète, l'ensemble des composés constitutifs des produits formulés n'ont pas été analysés. Il est donc possible que les différences entre les spectres des formulations soient dues à des bandes caractéristiques d'autres composés présents dans celles-ci. Par conséquent, les équations d'étalonnages seront réalisées d'une part sur l'ensemble du spectre et d'autre part sur la gamme réduite de longueurs d'onde, c'est-à-dire entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400nm.

Dans la suite des analyses, les spectres acquis ont été prétraités par une SNV suivie d'une dérivée (5, 2, 1) de façon à obtenir de meilleurs modèles.

## 2.2. Traitement des analyses par spectroscopie proche infrarouge en dosage moyen

Cette section présente les résultats de l'analyse exploratoire (PCA) ainsi que les résultats de prédiction des modèles de discrimination (PLSDA) et de calibration (PLS) des pesticides, développés à partir des données spectrales acquises en SPIR classique (Bruker MPA) et en imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan) sur le lot des 85 échantillons.

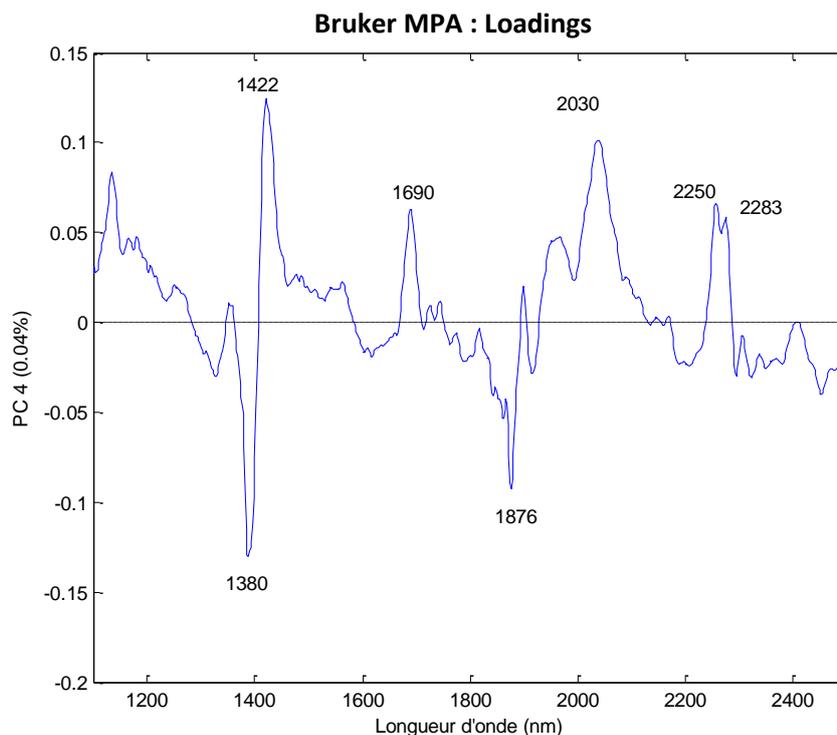
Lors de l'analyse des données, certains échantillons ont été écartés. C'est le cas des échantillons identifiés comme n'étant pas traités par la formulation indiquée lors de l'analyse chromatographique. Ces échantillons ont été écartés pour le développement de modèles de discrimination et de calibration des trois groupes de pesticide. Ils ont cependant été gardés pour le développement de modèles de discrimination entre les espèces et entre les semences traitées et non traitées.

### 2.2.1. Spectroscopie proche infrarouge classique (Bruker MPA)

#### Analyse exploratoire (PCA)

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales a été réalisée.

Afin d'obtenir des indications sur les équations de discrimination possibles. Comme attendu suite à l'analyse visuelle des spectres, la PCA montre sur la **Figure 44** que les trois espèces peuvent facilement être scindées. Cette discrimination se fait sur l'ensemble des longueurs d'onde couvertes par le Bruker MPA. Une fois les espèces de semences séparées, la **Figure 45** illustre la discrimination entre les échantillons de semences de blé traitées et non traitées. La PCA est capable de faire une séparation nette entre les semences traitées et non traitées au sein de chaque espèce. Cependant, au sein des semences traitées on ne voit pas de regroupement entre les échantillons appartenant à un même groupe de formulations. La **Figure 46** représente les loadings de la composante principale 4.



**Figure 46 : Loadings de la composante principale 4 de la Figure 45.** La figure montre le poids apporté aux différentes longueurs d'onde permettant de discriminer les semences de blé traitées et non traitées. Les longueurs d'onde expliquant au mieux la différence entre les semences traitées des semences non traitées sont 1380 nm, 1422 nm, 1690 nm, 1876 nm, 2030 nm, 2250 nm et 2283 nm.

On distingue sept pics permettant d'expliquer la séparation entre les échantillons traités et non traités : 1380 nm correspond à l'élongation et à la déformation des liaisons C-H des CH<sub>3</sub> et de CH<sub>2</sub>, 1422 nm correspond à l'élongation du lien O-H de l'eau, 1690 nm correspond à l'élongation des liaisons C-H des CH<sub>3</sub> et des aromatiques, 1876 nm correspond à l'élongation des O-H, 2030 nm correspond à l'élongation des liaisons C=O des amides, 2250 nm à l'élongation des liaisons C-Cl et 2283 nm à l'élongation des liaisons N=C (Osborne, 1986; Pigeon, 2003; Socrates, 1995). Ces deux derniers pics sont caractéristiques de la structure des matières actives et correspondent à ceux pointés lors de l'analyse visuelle des spectres.

Enfin, après avoir écarté les semences non traitées, la PCA ne parvient pas à distinguer clairement les groupes de formulations.

### Modèles de discrimination

Un arbre de classification dichotomique est construit dans lequel chaque nœud correspond à un modèle de discrimination (PLSDA) (**Figure 47**). L'équation 1 classe les échantillons en fonction de l'espèce à laquelle ils appartiennent. Pour chaque espèce, une équation sépare les échantillons suivant s'ils sont traités ou non. A chaque espèce est associée une équation de discrimination des échantillons traités et non traités (Eq 1.1, Eq. 1.2 et Eq. 1.3). Les échantillons d'épeautre dont nous disposons étant tous traités avec la formulation Kinto Duo (Groupe 1), la classification s'arrête là. Pour les échantillons de blé et d'orge, les échantillons catalogués comme traités sont classés en fonction du groupe de formulation à la quel ils appartiennent (Eq. 1.1.1 et Eq 1.2.1). Les équations de discrimination des espèces et des échantillons traités et non traités sont développées sur l'ensemble des longueurs d'onde contrairement aux équations de discrimination des trois groupes de formulations qui sont établies sur la gamme réduite de longueurs d'onde (1600-1800 nm et 2000-2400 nm)

Le **Tableau 17** reprend les matrices de confusion de chaque modèle appliquées sur le set de calibration, la validation croisée et le set de validation afin de montrer leur performance.

Afin d'obtenir un modèle valide, il est essentiel que les valeurs des matrices de confusion du set de calibration et de validation croisée soient proches. Hormis l'équation Eq1.1.1, les autres équations peuvent être considérées comme valides puisque leurs matrices de confusion de calibration et de validation croisée sont identiques. Le modèle de discrimination des groupes de formulation pour le blé ne présente tout de même pas d'écart supérieur à 10 % entre les valeurs de calibration et de validation croisée.

Le premier modèle a pour but de séparer les trois espèces de semences entre elles. En se basant sur les résultats obtenus sur la validation croisée et sur le set de validation, on constate que le modèle généré est capable de prédire à 100 % si l'échantillon est composé de semence de blé d'orge ou d'épeautre.

La deuxième étape consiste à discriminer les semences traitées des non traitées au sein de chaque espèce. Les trois modèles obtenus sont également capables de classer correctement 100 % des échantillons en traité et non traité.

En ce qui concerne la discrimination entre les groupes d'une espèce, les modèles ne permettent pas une bonne discrimination des groupes. Malgré les résultats de la validation croisée satisfaisants, à savoir 73,3 % des échantillons bien classés pour le groupe 1, 86,3 % pour le groupe 2 et 83,3 % pour le groupe 3 pour les semences de blé et 100 % des échantillons bien classés pour l'orge. Lorsqu'on regarde les résultats pour le set de validation, le groupe 1 est particulièrement mal classé puisqu'aucun échantillon traité avec une formulation appartenant au groupe 1, aussi bien pour le blé que pour l'orge, n'est bien classé. Néanmoins, les résultats pour les groupes 2 et 3 sont meilleurs. En effet, les semences de blé et d'orge traitées avec une formulation du groupe 2

sont bien classées à respectivement 75 % et 100 %. Pour les formulations appartenant au groupe 3, 100 % des semences de blé et d'orge sont bien classées. Cependant 40 % des semences de blés sont injustement classées dans le groupe 3. Ces 40 % reprennent les semences du groupe 1 et une petite partie du groupe 2. Pour les semences d'orge, c'est dans le groupe 2 qu'on retrouve 33,3 % de semences mal classées. Ces 33,3 % correspondent aux semences d'orge traitées avec des formulations du groupe 1.

### Modèles de calibration

En plus des modèles de discrimination, des modèles de calibration ont été développés sur les lots de semences traitées avec Kinto Duo et Redigo et dont les teneurs en pesticides ont été analysées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces modèles ont pour objectif de relier les concentrations en matières actives mesurées par la méthode de référence avec les spectres acquis sur le Bruker MPA.

Afin d'établir un lien entre la teneur en matières actives dans un échantillon et son spectre, 40 modèles ont été établis. Les résultats de ces modèles sont résumés dans l'**Annexe 3**. Parmi ces 40 modèles, la moitié (20 modèles) a été réalisée en prenant le spectre moyen des trois spectres mesurés par échantillon. L'autre moitié (20 modèles) des modèles a été établie en tenant compte des trois spectres. Dans les deux groupes de 20 modèles, la première moitié tient compte de l'ensemble des longueurs d'onde parcourues lors de l'analyse infrarouge. La seconde moitié ne prend en compte que les zones où les pics caractéristiques de la structure chimique des matières actives sont nombreux, c'est-à-dire entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm. Au sein de chaque classe de modèle, on trouve différentes stratégies. La première consiste à prendre tous les échantillons et en prédire la teneur en matières actives totale. Cela signifie qu'on ne distingue pas l'espèce à laquelle appartient l'échantillon, ni la formulation avec laquelle il a été traité. La seconde stratégie est de prédire la teneur totale en matières actives, mais en séparant les trois espèces de semences. Les troisième et quatrième stratégies consistent à prédire la teneur en matières actives d'un échantillon en séparant ceux traités avec la formulation Kinto Duo de ceux traités avec le Redigo. Dans la troisième stratégie, les trois espèces de semences sont considérées simultanément, alors que dans la quatrième stratégie un modèle est établi pour chaque espèce séparément.

Parmi ces modèles, les meilleurs résultats sont observés pour les trois répétitions (trois spectres par échantillon) sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'onde. Les critères sélectionnés pour déterminer les meilleurs modèles sont un RMSEC et un RMSECV faibles et un coefficient de détermination élevé ( $R^2$ ).

Le **Tableau 19** présente les résultats des modèles de prédiction de la teneur moyenne en matières actives totales des formulations Kinto Duo et Redigo établie sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'onde pour les échantillons d'orge. Le nombre d'échantillons utilisé est donc de 8 pour la calibration (3 orges non traités, 1 traité au Kinto Duo et 4 au Redigo) et de 2 pour la validation (1 pour le Redigo et 1 pour le Kinto Duo). Les valeurs présentées dans les tableaux sont exprimées en g / 100 kg de semence. Le premier modèle est établi à partir de la moyenne des trois spectres par échantillon et le second en prenant l'ensemble des trois spectres. Dans les deux modèles, les sets de calibration et de validation sont construits avec les mêmes échantillons. Dès lors, la moyenne des échantillons de 6,52 g / 100 kg de semences, l'écart-type de 3,77 g / 100 kg ainsi que les valeurs minimums et maximums sont les mêmes.

Le premier modèle résume les résultats de l'équation de calibration issue du modèle établi à partir du spectre moyen par échantillon. L'équation composée de quatre termes est illustrée à la **Figure 48**. Le RMSEC est de 1,37, le RMSECV de 4,72, le RMSEP de 2,95 et le  $R^2$  de 0,82. Les erreurs quadratiques sont relativement faibles, et les valeurs du RMSEC et du RMSEP sont proches. Cependant le rapport entre l'écart-type et le RMSECV ( $RPD_{cv}$ ) de 0,80 est trop faible pour permettre une analyse quantitative.

Le second modèle résume les résultats de l'équation de calibration, établie à partir des trois spectres mesurés par échantillon, représentée dans la **Figure 48**. Six termes composent l'équation. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans le tableau précédent, avec cependant un écart plus important entre le RMSEC et le RMSEP, mais un  $R^2$  supérieur de 0,87. Le  $RPD_{cv}$  ne permet pas non plus une analyse quantitative.

Le **Tableau 20** résume les résultats issus de l'application des deux modèles (**Tableau 19**) sur les échantillons traités au Kinto Duo et au Redigo en les comparant aux valeurs de référence obtenues par la chromatographie.

**Tableau 20 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Bruker MPA.**

Formulation	Matière active	n	% Dose cible				CV	% Echantillon		
			Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	± 30%
<b>Chromatographie liquide à ultra performance</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	73,9	8,4	68	79,9	11,4	50,0	0,0	50,0
Redigo	Prothioconazole	5	52,1	15,1	34,2	66,9	29,0	100,0	0,0	100,0
<b>Spectre moyen</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	58,9	19,2	45,3	72,4	32,5	50,0	0,0	50,0
Redigo	Prothioconazole	5	58,1	19,0	40,1	83,2	32,7	60,0	0,0	60,0
<b>3 spectres</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	61,5	15,8	44,5	79,4	25,7	50,0	0,0	50,0
Redigo	Prothioconazole	5	58,7	20,5	35,2	97,7	34,9	73,3	0,0	73,3

Le tableau résume pour chaque traitement (Kinto Duo et Redigo) les résultats des teneurs moyennes en matières actives obtenus sur l'ensemble des échantillons. Ces résultats sont donnés pour les valeurs de référence obtenues par la chromatographie liquide à ultra performance et pour les valeurs prédites d'une part par le modèle établi sur les spectres moyens et d'autre part par le modèle établi sur les 3 spectres acquis par le Bruker MPA. Les résultats sont donnés pour le Kinto Duo, en sommant les deux matières actives (prochloraz et triticonazole). La dose cible du prochloraz + triticonazole est de 16 g/100 kg et de 10 g/100 kg pour le prothioconazole. n = nombre d'échantillons ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; CV = coefficient de variation ; < 30 % = pourcentage des échantillons sous-dosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est inférieure à 30 % en dessous de la dose cible ; > 30 % = pourcentage des échantillons surdosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est supérieure à 30 % au-dessus de la dose cible ; +/- 30 % = pourcentage des échantillons mal dosés, c'est-à-dire la somme des échantillons sous et surdosés. Les valeurs des Moy, SD, min et max sont exprimées en pourcentage de la dose cible (100 % correspondant à la dose cible). < 30 %, > 30 % et ± 30 % sont exprimées en pourcentage d'échantillons.

On constate d'une part que les deux modèles sous-estiment les teneurs en matières actives du Kinto.

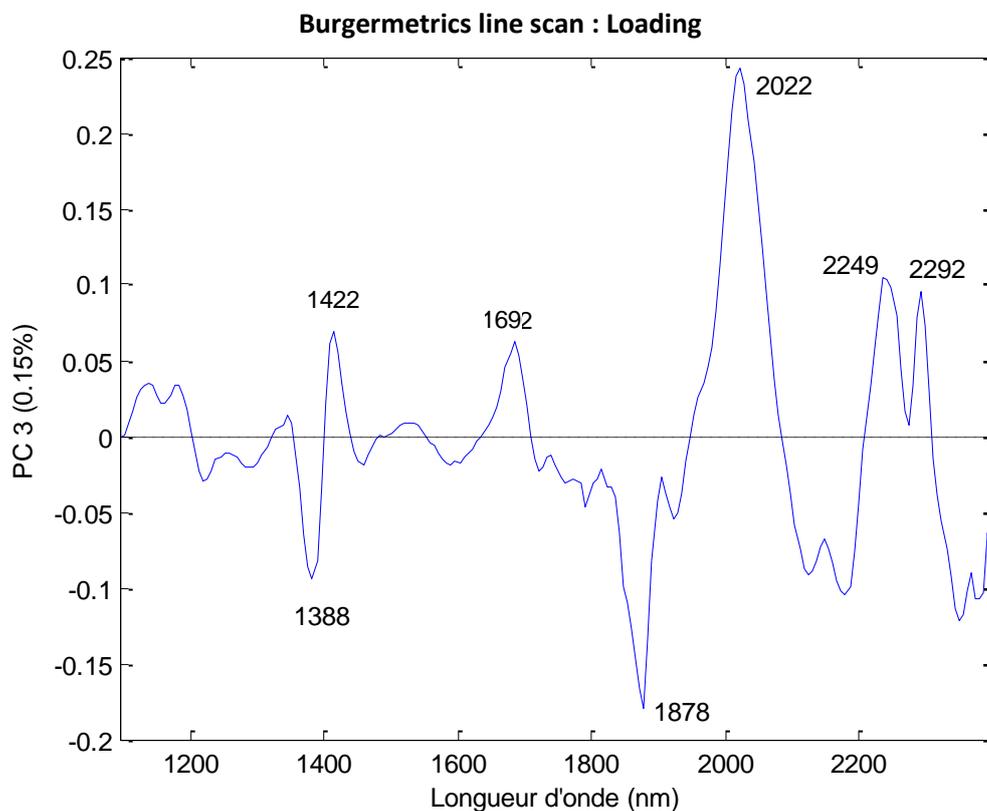
En effets, aussi bien les moyennes que les valeurs minimales et maximales sont sous-estimées. Cependant, les deux modèles sont capables de prédire de la même façon que la méthode de référence que 50 % des échantillons sont sous-dosés. D'autre part, ces mêmes modèles surestiment la teneur en matière active du Redigo. En gonflant les valeurs des teneurs en matières actives, les modèles ne détectent pas que l'ensemble des échantillons sont sous-dosés. Le modèle établi sur les spectres moyens ne prédit que 60 % et celui établi sur les 3 spectres prédit 73,3 % des échantillons sous-dosés. Enfin, pour les deux modèles, les écarts-types sont plus importants que pour la méthode de référence.

## 2.2.2. Imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Burgermetrics line scan)

### Analyse exploratoire (PCA)

Comme pour le Bruker MPA, une analyse en composantes principales était réalisée. Les échantillons ayant servi à cette analyse sont les mêmes que pour le Bruker MPA.

De la même manière que les analyses réalisées à partir des spectres du Bruker MPA, la PCA montre sur les **Figures 49 et 50** que les trois espèces ainsi que les échantillons traités et non traités peuvent être discriminés. On voit cependant dans la **Figure 49** que la classe des semences d'orge est divisée en deux. Cette différence s'explique, selon les loadings, par une différence de la teneur en eau entre ces échantillons. La **Figure 51** représente les loadings de la composante principale 3 permettant de discriminer les semences traitées des non traitées dans le cas du blé. On distingue les sept mêmes pics permettant d'expliquer la séparation entre les échantillons traités et non traités que sur la PCA établie sur les spectres du Bruker (1388 nm, 1422 nm, 1692 nm, 1878 nm, 2022 nm, 2249 nm et 2292 nm). Enfin, analogiquement aux résultats obtenus avec le Bruker MPA, PCA ne parvient pas à distinguer clairement les groupes de formulations au sein des échantillons traités.



**Figure 4 : Loadings de la composante principale 3 de la Figure 50.** La figure montre le poids apporté aux différentes longueurs d'onde permettant de discriminer les semences de blé traitées et non traitées. Les longueurs d'onde expliquant au mieux la différence entre les semences traitées des semences non traitées sont 1388 nm, 1422 nm, 1692 nm, 1878 nm, 2022 nm, 2249 nm et 2292 nm.

### Modèles de discrimination

Les spectres obtenus en dosage moyen sont dans un premier temps utilisés pour discriminer les espèces de semences, et le traitement auquel elles ont été soumises. Pour cette section, le même arbre de classification dichotomique (**Figure 47**), les mêmes échantillons et les mêmes longueurs d'onde sont utilisés que pour les modèles de discrimination du Bruker. Le **Tableau 21**

reprend les matrices de confusion de chaque modèle appliquées sur les sets de calibration, la validation croisée et les sets de validation afin de montrer leur performance.

**Tableau 21 : Performance des modèles de discrimination conçus à partir des spectres acquis avec le Burgermetrics line scan.**

Modèle	Classe	Calibration			Validation croisée		Validation		
		n <sub>c</sub>	TP	FP	TP	FP	n <sub>v</sub>	TP	FP
Blé vs. orge vs. épeautre	Blé	51	100	0	100	0	8	100	0
	Orge	17	100	0	100	0	4	100	0
	Epeautre	4	100	0	100	0	1	100	0
<b>Blé</b>									
Traité vs. non traité	Traité	48	96,6	4,1	96,3	4,1	8	96,9	NaN
	Non traité	3	95,8	3,4	95,8	3,6	0	NaN	3,1
Groupe 1 vs. 2 vs. 3	Groupe 1	5	50	14,1	40	20	1	0	3,57
	Groupe 2	17	71,3	20,8	65,4	27,5	4	43,7	50
	Groupe 3	10	68,7	12,5	58,7	15,9	3	25	65
<b>Orge</b>									
Traité vs. non traité	Traité	14	89	16,7	87,2	16,7	4	87,5	NaN
	Non traité	3	83,3	10,9	83,3	12,7	0	NaN	12,5
Groupe 1 vs. 2 vs. 3	Groupe 1	1	87,5	26,6	62,5	28,7	1	25	20
	Groupe 2	6	45,6	7,1	41,3	87,5	1	0	12,5
	Groupe 3	6	77,1	14,8	68,7	79,6	2	93,7	43,7
<b>Epeautre</b>									
Traité vs. non traité	Traité	2	100	7,1	93,7	14,2	1	100	NaN
	Non traité	2	92,9	0	85,7	6,2	0	NaN	0

Le tableau résume les matrices de confusion des sets de calibration, de la validation croisée et du set de validation des modèles de discrimination des échantillons de semences présentés dans la **Figure 47**. Les données sont exprimées en pourcentage (%). NaN signifie qu'il n'y a pas de données. En effet, le set de validation ne contient que des semences traitées. TP (true positive) correspond à la sensibilité, c'est le pourcentage d'échantillons, provenant de la classe étudiée, et que le modèle prédit comme tel. FP (false negative) est le pourcentage d'échantillons prédit comme venant de la classe étudiée alors que ce n'est pas le cas. Blé vs. orge vs. épeautre correspond au modèle de discrimination des trois espèces de semences. Traité vs. non traité est le modèle de discrimination des échantillons traités ou non traité au sein de chaque espèce. Groupe 1 vs. 2 vs. 3 est le modèle discriminant à laquelle des trois groupes de formulations appartient un échantillon traité. N<sub>c</sub> = nombre d'échantillons du set de calibration ; n<sub>v</sub> = nombre d'échantillons du set de validation.

Les modèles issus des spectres acquis avec le Burgermetrics line scan présentent des matrices de confusion moins performantes que pour les spectres issus du Bruker MPA. De plus, les résultats de la validation croisée sont plus éloignés de ceux de la calibration, particulièrement pour la discrimination des trois groupes ainsi que pour le classement des semences d'épeautre en traitées et non traitées.

Le premier modèle, séparant les trois espèces de semences, est capable de classer correctement 100 % des échantillons. Les modèles suivants ont pour but de discriminer les semences traitées des non traitées au sein de chaque espèce. Ils permettent pour chaque espèce de séparer les échantillons en traité et non traité. Cependant leurs matrices de confusion sont moins bonnes que celles établies à partir des spectres acquis avec le Bruker MPA. En effet, ces modèles permettent d'identifier pour les semences de blé, d'orge et d'épeautre respectivement 96,6 %, 89 % et 100 % des semences traitées et 95,8 %, 83,3 % et 92,9 % des semences non traitées. En ce qui concerne la discrimination entre les groupes d'une espèce, les modèles ne permettent pas une bonne discrimination des groupes. Etant donnée la sensibilité médiocre du modèle établi sur le set de calibration, les résultats de la validation croisée et de la validation externe ne peuvent pas être satisfaisants.

## Modèles de calibration

40 modèles ont également été établis avec les spectres issus du Burgermetrics line scan, en utilisant les mêmes stratégies que pour les spectres du Bruker MPA. Les résultats de ces modèles sont présentés dans l'**Annexe 3**. Ces modèles ont pour objectif de relier la teneur moyenne en matières actives mesurée par la méthode de référence avec les spectres acquis avec le Burgermetrics line scan.

Les modèles dont les paramètres sont présentés dans le **Tableau 22** sont les mêmes que ceux établis avec les spectres issus du Bruker MPA. Ils représentent le lien entre les teneurs moyennes en matières actives totales mesurées avec la méthode de référence et les spectres acquis par le Burgermetrics line scan sur les semences d'orge. Les teneurs moyennes correspondent aux matières actives des formulations Kinto Duo et Redigo. L'ensemble de la gamme de longueurs d'onde est pris en compte lors de l'établissement des modèles. Aussi, les échantillons analysés sont les mêmes que pour le Bruker MPA. Par conséquent le nombre d'échantillons, la moyenne (6,52 g/100 kg), l'écart-type (3,77 g/100 kg) et les minimums et maximums sont également les mêmes que pour les modèles dont les paramètres sont présentés dans le **Tableau 19**.

Le **Tableau 22** présente les résultats des modèles de prédiction de la teneur moyenne en matières actives totales des formulations Kinto Duo et Redigo établis sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'onde pour les échantillons d'orge. La **Figure 52** de gauche représente l'équation de calibration issue du modèle établi à partir du spectre moyen par échantillon. La première ligne du **Tableau 22** résume les résultats de cette équation qui est composée de quatre termes. Le RMSEC est de 0,71 le RMSECV de 6,16, le RMSEP de 3,49 et le  $R^2$  de 0,87. Les erreurs quadratiques sont relativement faibles, et les valeurs du RMSEC et du RMSEP sont proches. Le rapport entre l'écart-type et le RMSECV ( $RPD_{cv}$ ) de 0,61 ce qui est légèrement inférieur au résultat pour le même modèle en Bruker MPA et donc trop faible pour permettre une analyse quantitative. La deuxième ligne du **Tableau 22** résume les résultats de l'équation de calibration établie à partir des huit spectres mesurés par échantillon et illustrée dans la **Figure 52** de droite. Six termes composent l'équation. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans le tableau précédent, avec cependant un écart moins important entre le RMSEC et le RMSEP, mais un  $R^2$  inférieur de 0,72. Le  $RPD_{cv}$  de 1,24 ne permet pas non plus une analyse quantitative.

Le **Tableau 23** résume les résultats issus de l'application des deux modèles sur les échantillons traités au Kinto Duo et au Redigo présenté dans le **Tableau 22** en les comparant aux valeurs de référence obtenues par la chromatographie.

Comme pour les modèles issus du Bruker MPA, les deux modèles sous-estiment les teneurs en matières actives du Kinto duo. Le modèle établi à partir des spectres moyens, permet de détecter les 50 % d'échantillons sous-dosés et celui établi sur les huit spectres, 43,8 % échantillons sous-dosés contre 50 % pour la méthode de référence. Les prédictions des teneurs en matière active du Redigo sont proches des valeurs de référence pour le modèle établi sur les spectres moyens. Pour le modèle établi à partir des 8 spectres, la moyenne prédite est semblable à la méthode de référence, cependant, on constate que pour les prédictions, le minimum est nettement inférieur à celui des valeurs de référence et le maximum nettement supérieur, impliquant un coefficient de variation élevé.

**Tableau 23 : Teneurs moyennes en matières actives par échantillon mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Burgermetrics line scan.**

Formulation	Matière active	n	% Dose cible				CV	% Echantillons		
			Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	± 30%
<b>Chromatographie liquide à ultra performance</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	73,9	8,4	68	79,9	11,4	50,0	0,0	50,0
Redigo	Prothioconazole	5	52,1	15,1	34,2	66,9	29,0	100,0	0,0	100,0
<b>Spectre moyen</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	59,3	24,4	42,1	76,6	41,1	50,0	0,0	50,0
Redigo	Prothioconazole	5	48,4	14,5	32,4	66,1	30,0	100,0	0,0	100,0
<b>8 spectres</b>										
Kinto Duo	Prochloraz + triticonazole	2	63,2	7,4	48,4	73,0	11,77	43,8	0,0	43,8
Redigo	Prothioconazole	5	50,2	20,5	16,9	91,3	40,8	87,5	0,0	87,5

Le tableau résume pour chaque traitement (Kinto Duo et Redigo) les résultats des teneurs moyennes en matières actives obtenus sur l'ensemble des échantillons. Ces résultats sont donnés pour les valeurs de référence obtenues par la chromatographie liquide à ultra performance et pour les valeurs prédites d'une part par le modèle établi sur les spectres moyens et d'autre part par le modèle établi sur les 8 spectres acquis par le Burgermetrics line scan. Les résultats sont donnés pour le Kinto Duo, en sommant les deux matières actives (prochloraz et triticonazole). La dose cible du prochloraz + triticonazole est de 16 g/100 kg et de 10 g/100 kg pour le prothioconazole. n = nombre d'échantillons ; Moy = teneur moyenne en matières actives ; SD = écart-type ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; CV = coefficient de variation ; < 30 % = pourcentage des échantillons sous-dosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est inférieure à 30 % en dessous de la dose cible ; > 30 % = pourcentage des échantillons surdosés, c'est-à-dire quand la teneur moyenne en matières actives est supérieure à 30 % au-dessus de la dose cible ; +/- 30 % = pourcentage des échantillons mal dosés, c'est-à-dire la somme des échantillons sous et surdosés. Les valeurs des Moy, SD, min et max sont exprimées en pourcentage de la dose cible (100 % correspondant à la dose cible). < 30 %, > 30 % et ± 30 % sont exprimées en pourcentage d'échantillons.

### 2.2.3. Discussion

Pour les mêmes échantillons, les spectres acquis par le Bruker MPA et par le Burgermetrics line scan, présentent des profils semblables dans les mêmes gammes de longueurs d'onde.

L'analyse exploratoire (PCA) permet de séparer dans un premier temps les échantillons en fonction de leur espèce et dans un second temps les échantillons traités des non traités. L'analyse des loadings montre que les liaisons C-Cl et N=C caractéristiques des matières actives jouent un rôle important dans la discrimination des semences traitées et non traitées. Cependant, ces liaisons étant présentes dans les différentes matières actives, il est difficile de séparer les groupes entre eux.

En analysant les résultats des modèles de discrimination sur un échantillon donné, il est possible de déterminer à quelle espèce appartiennent les semences et si elles sont traitées ou non. En effet, le Bruker MPA et le Burgermetrics line scan sont tous deux capables de discriminer parfaitement les semences de blé, d'orge et d'épeautre. Pour les autres modèles de discrimination, les modèles établis sur les spectres acquis par le Bruker MPA sont plus sensibles que ceux établis par l'imagerie hyperspectrale. En effet, la sensibilité du Bruker MPA pour les modèles de discrimination des semences traitées et non traitées est maximale (100 %) alors qu'elle varie entre 83,3 et 96,3 % pour les modèles issus du Burgermetrics line scan. En ce qui concerne la discrimination des groupes, ni le Bruker MPA ni le Burgermetrics line scan ne sont capables de distinguer clairement les trois groupes. Néanmoins, le Bruker MPA est capable pour le blé de détecter les semences traitées avec une formulation appartenant au groupe 3 et pour l'orge au

groupe 2 et 3. Il pourrait être intéressant de reconduire l'étude sur des échantillons parfaitement traités à la dose cible afin d'évaluer si la performance des modèles de discrimination peut être améliorée.

Comme observé dans le doctorat d'O. Pigeon (2003), les modèles de calibration développés montrent qu'il est possible de prédire la teneur moyenne en matières actives dans des échantillons de blé, d'orge et d'épeautre avec des coefficients de détermination pouvant atteindre les 90 % dans certains cas. Les meilleurs résultats sont obtenus en prenant les trois spectres de chaque échantillon sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'onde mesurés avec le Bruker MPA. Mais les résultats obtenus avec le Burgermetrics line scan sont également remarquables. En effet, lorsqu'on applique les modèles aux échantillons traités avec le Redigo, on constate que le modèle établi sur les spectres moyens prédit des teneurs en matières actives similaires à celles obtenues avec la méthode de référence. Inversement, le même modèle créé à partir des spectres moyens acquis par le Bruker surestime les teneurs en matière active du Redigo. Pour les deux instruments, le Bruker MPA et le Burgermetrics line scan, les prédictions des teneurs en matières actives du Kinto Duo sont sous-estimées par rapport à la méthode de référence. Il est par conséquent fort probable qu'avec un nombre plus important d'échantillons, les modèles établis en séparant à la fois les espèces et les formulations Kinto Duo et Redigo permettraient de meilleures prédictions.

Dans l'ensemble, les modèles établis ne sont pas aussi performants que ceux créés par O. Pigeon (2003), même s'ils s'en rapprochent fortement. En effet, pour ces calibrations O. Pigeon disposait de 116 échantillons, ce qui est presque trois fois supérieur au nombre d'échantillons dont nous disposons.

On obtient de particulièrement bons résultats sur les semences d'orge et de blé comparé aux semences d'épeautre. Ceci s'explique par le fait qu'on dispose d'un très faible nombre d'échantillons d'épeautre. Il est donc fort probable qu'en refaisant ces équations sur un plus grand nombre d'échantillons les prédictions seraient encore meilleures. Pour les quatre équations de calibrations présentées, la RMSEP sort de l'intervalle de confiance. Afin d'améliorer la RMSEP, de nouveaux échantillons doivent être intégrés pour augmenter la variabilité entre échantillons et ainsi obtenir un étalonnage plus juste. De plus, les  $RPD_{cv}$  obtenus sont tous inférieurs à 5 ce qui est trop faible pour une analyse quantitative. Néanmoins, certains  $RPD_{cv}$  sont supérieurs à 2 permettant ainsi de séparer les échantillons en deux classes. C'est le cas pour le modèle de prédiction de la teneur en matières actives totale sur les semences d'orge issu du Bruker MPA, dont le  $RPD_{cv}$  est de 2,5. Ce modèle permet donc de classer les lots de semences en sous ou surdosés.

Afin d'établir de bonnes discriminations et permettre une analyse quantitative de la teneur en matières actives dans un échantillon, il est impératif d'augmenter le nombre d'échantillons inclus dans la calibration afin de mieux prendre en compte la variabilité entre les lots.

## 2.3. Traitement des analyses par spectroscopie proche infrarouge en dosage semence par semence

### 2.3.1. Résultats

Cette section présente les résultats de modèles de discrimination (PLSDA) permettant de détecter les zones non traitées sur les semences des 85 échantillons et les résultats des modèles de calibration des matières actives, développés à partir des données spectrales acquises en imagerie hyperspectrale proche infrarouge sur les 96 semences de 6 lots.

#### Modèles de Discrimination

La classification dichotomique de modèle illustrée dans la **Figure 47** a été établie cette fois en considérant le spectre de chaque pixel. Les performances des modèles sont reprises dans l'**Annexe 4**.

Les modèles ont ensuite été appliqués aux images de 8 semences des 85 échantillons. Le modèle a classé chaque pixel de chaque semence en fonction de l'espèce, l'absence ou la présence de traitement, et dans le cas échéant le groupe auquel appartient le traitement. Pour voir si les semences sont bien classées ou non, des conditions ont été posées en fonction des différentes classes. Pour les espèces, la classe dans laquelle la majorité des pixels a été classée sera définie comme étant la classe à laquelle appartient la semence. Le même principe est utilisé pour classer les semences traitées en fonction du groupe de formulation. Pour classer les semences traitées et non traitées en tenant compte de la présence de semences mal traitées, il a été posé que si 75 % des pixels de la semence sont identifiés comme non traités, la semence est classée en non traité. Le **Tableau 24** résume le pourcentage de semences bien classées. C'est-à-dire le nombre de semences bien prédites par rapport au nombre total de semences présentes dans la catégorie. Ces données sont fournies pour le set de calibration et le set de validation.

Le premier modèle consistant à trier les semences en fonction de leur espèce, classe correctement 100 % des semences du set de calibration et 99,1 % du set de validation. La seconde étape est de classer les semences en fonction de si elles ont été traitées ou non. Ces modèles sont également performants puisqu'ils permettent de bien classer 97,8 % des semences du set de calibration et 90,5 % des semences du set de validation. Comme pour les modèles précédents établis à partir du spectre moyen de la graine, la discrimination des trois groupes de formulation ne donne pas de résultats satisfaisants.

Les **Figures 53, 54 et 55** présentent le résultat des modèles de discrimination des pixels traités et non traités appliqués sur une semence de blé, d'orge et d'épeautre. Ces images sont mises en parallèle avec les photos des semences prises avant d'être analysées par le Burgermetrics line scan.

En comparant ces images, on constate que le modèle est capable d'identifier assez bien les zones traitées (blanc) des zones non traitées (gris). La précision n'est cependant pas optimale. On constate notamment sur la semence d'orge, que la moitié inférieure de la semence est identifiée comme non traité alors qu'en regardant la photo, on y distingue de petites zones non traitées. Ceci peut s'expliquer par la résolution du Burgermetrics line scan qui n'est pas assez précise pour distinguer chaque point de la semence. En effet, le spectre est mesuré sur un pixel, c'est-à-dire un carré de 0,3 x 0,3 mm. Si dans ce carré se trouvent à la fois des zones traitées et non traitées, l'instrument ne pourra pas les distinguer puisqu'un seul spectre global sera acquis. Le nombre de pixels mesurés peut être utilisé pour calculer sur chaque semence le pourcentage de la semence qui est traité. Pour la semence de blé, 27 % de la semence n'est pas traité (**Figure 53**). Pour la semence d'orge 67 % (**Figure 54**) et pour la semence d'épeautre 31 % (**Figure 55**).

## Modèles de calibration

Le **Tableau 25** présente les paramètres statistiques des équations de calibration de la teneur en matières actives du Kinto Duo (Prochloraz et triticonazole) établie pour les semences de blé, d'orge et d'épeautre. Les deux échantillons de chaque espèce ont été rassemblés pour augmenter la gamme des teneurs en matières actives, permettant ainsi d'améliorer les résultats des modèles.

**Tableau 25 : Equation d'étalonnage de la teneur en matières actives par semence établie à partir des spectres acquis avec la caméra Burgermetrics line scan.**

	$n_c$	$n_v$	Moy	SD	Min	Max	RMSEC	RMSECV	RMSEP	RPD <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup>
<b>Blé</b>											
g/100 kg	35	10	21.52	9.82	5.73	40.85	3.35	7.02	6.75	1.40	0.80
<b>Orge</b>											
g/100 kg	36	9	7.96	3.90	3.52	17.44	1.46	4.80	2.34	0.81	0.82
<b>Épeautre</b>											
g/100 kg	35	10	29.00	31.87	7.46	136.25	18,51	33,94	17,44	0.93	0.68

Le tableau présente les paramètres statistiques des équations de calibration de la teneur en matières actives du Kinto Duo (Prochloraz et triticonazole) établie pour les semences de blé, d'orge et d'épeautre. La première ligne reprend les résultats du modèle établi sur base des spectres de 24 semences de l'échantillon n° 20 de blé et de 24 semences de l'échantillon n° 51 de blé. Trois valeurs aberrantes ont été supprimées parmi les 38 échantillons ayant servi au set de calibration. L'équation est construite avec cinq variables latentes. La seconde ligne reprend les résultats du modèle établi sur base des spectres de 24 semences de l'échantillon n° 74 d'orge et 24 semences de l'échantillon n° 75 d'orge. Deux valeurs aberrantes ont été supprimées parmi les 38 échantillons ayant servi au set de calibration et une parmi le set de validation. L'équation est construite avec sept variables latentes. La dernière ligne reprend les résultats établis sur base des spectres de 24 semences de l'échantillon n° 57 d'épeautre et de 24 semences de l'échantillon n° 58 d'épeautre. Trois valeurs aberrantes ont été supprimées parmi les 38 échantillons ayant servi au set de calibration. L'équation est construite avec sept variables latentes. L'ensemble des spectres utilisés pour générer ces équations ont été traités avec une SNV et une dérivée (5, 2, 1).  $n_c$  = nombre de semences utilisées pour la calibration ;  $n_v$  = nombre de semences utilisées pour la validation ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type des valeurs de référence ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration ; RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée ; RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; CLRMSEP = intervalle de confiance de l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; RPD<sub>cv</sub> = le ratio de déviation de la performance de la validation croisée ; R<sup>2</sup> = le coefficient de détermination des sets de calibration et de prédiction.

La première ligne du **Tableau 25** résume les résultats de l'équation de calibration issus du modèle établi à partir des semences de blé illustrée dans la **Figure 56**. Les valeurs sont exprimées en g/100 kg de semences. Le RMSEC est de 3,35, le RMSECV de 7,02, le RMSEP de 6,75 et le R<sup>2</sup> de 0,80 ce qui est assez bon.

Les résultats de l'équation de calibration établie à partir des semences d'orge sont repris dans le **Tableau 25** et représentés dans la **Figure 57**. Les RMSEC, RMSECV et RMSEP sont plus faibles que pour le blé (respectivement 1,46, 4,8 et 2,34) et le R<sup>2</sup> de 0,82 encore meilleur.

Cependant, les RPD<sub>cv</sub> des deux espèces sont faibles, ne permettant pas une analyse quantitative.

Les résultats sur les semences d'épeautre sont nettement moins bons. Le **Tableau 25** résume les résultats de l'équation de calibration. L'équation est présentée dans la **Figure 58**. Le RMSEC est de 18,51, le RMSECV de 33,94, le RMSEP de 17,44 sont très élevés, et le R<sup>2</sup> de 0,68 trop faible. Contrairement aux deux équations précédentes, celle établie sur l'épeautre ne permet pas une bonne estimation de la teneur en matières actives sur les semences d'un lot.

Afin de visualiser si on arrive à prédire la distribution des semences d'un lot en fonction de leur teneur en matières actives, les résultats de l'application des modèles sur les 96 semences de chaque échantillon sont présentés dans le **Tableau 26** et illustrés dans les **Figures 59, 60, 61 et 62**. Les teneurs en matières actives sont exprimées en pourcentage de la dose cible. On distingue sur ces graphes la distribution des 24 semences utilisées pour calibrer le modèle en fonction des résultats

chromatographiques d'une part et spectroscopiques d'autre part, et la distribution des 72 autres semences prédite par le modèle.

**Tableau 26 : Teneurs moyennes en matières actives par semences mesurées par chromatographie liquide à ultra performance et prédites par les modèles issus du Bruker MPA.**

Échantillon	Formulation	n	% Dose cible				CV	% Semences		
			Moy	SD	Min	Max		<30%	>30%	± 30%
<b>Chromatographie liquide à ultra performance</b>										
Blé										
20		24	86,6	30,3	35,8	159,0	37,6	33,3	4,2	37,5
51		24	239,7	147,5	143,7	795,7	61,5	0,0	100,0	100,0
Orge										
74		24	49,6	30,5	23,1	149,2	61,6	83,3	4,2	87,5
75		24	55,2	27,5	22,0	107,2	50,0	70,9	0,0	70,9
<b>Burgermetrics line scan</b>										
Blé										
20		24	93,6	26,3	40,7	165,6	28,1	12,5	8,3	20,8
51		24	187,3	35,7	115,2	269,4	19,0	0,0	95,8	95,8
Orge										
74		24	44,5	22,1	8,5	103,5	49,6	87,5	0,0	87,5
75		24	49,5	25,0	17,1	93,7	50,4	79,2	0,0	79,2

Le tableau résume pour le traitement Kinto Duo les résultats des teneurs en matières actives obtenus sur les 24 semences du set de calibration des échantillons 20 et 51 de blé et 74 et 75 d'orge. Ces résultats sont donnés pour les valeurs de référence obtenues par la chromatographie liquide à ultra performance et pour les valeurs prédites obtenues par les modèles présentés dans le **tableau 24** du Burgermetrics line scan. Les résultats sont donnés pour le Kinto Duo, en sommant les deux matières actives (prochloraz et triticonazole). La dose cible du prochloraz + triticonazole est de 16 g/100 Moy = teneur moyenne en matières actives ; SD = écart-type ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; CV = coefficient de variation ; < 30 % = pourcentage des semences sous-dosées, c'est-à-dire que la teneur moyenne en matières actives est inférieure à 30 % en dessous de la dose cible ; > 30 % = pourcentage des semences surdosées, c'est-à-dire que la teneur moyenne en matières actives est supérieure à 30 % au-dessus de la dose cible ; +/- 30 % = pourcentage des semences mal dosées, c'est-à-dire la somme des semences sous et surdosées. Les valeurs des Moy, SD, min et max sont exprimées en pourcentage de la dose cible (100 % correspondant à la dose cible). < 30 %, > 30 % et ± 30 % sont exprimées en pourcentage de semences.

La **Figure 59** correspond à la distribution des semences pour l'échantillon de blé n° 20. On constate que l'allure de la distribution du nombre de semences du set de calibration est la même pour les données de référence et les données prédites, allant d'un sous-dosage à 35,8 % pour les valeurs de référence et à 40,7 % pour les valeurs prédites, à un surdosage de respectivement 159 % et 165,6 %, avec toutefois une moyenne à 86,6 % et 93,6 % respectivement. On observe en effet une surestimation des teneurs en matières actives prédites ce qui entraîne qu'on ne détecte pas toutes les semences sous-dosées et qu'inversement on observe trop de semences surdosées. La courbe de distribution du nombre de semences du set de prédiction (72 autres semences) est aussi étalée que les courbes de calibration, avec une moyenne à 103 % de la dose cible.

La distribution des semences de l'échantillon n° 51 de blé est représentée dans la **Figure 60**. On observe, pour le set de calibration, une allure similaire pour les valeurs prédites et les valeurs de référence. Néanmoins, les teneurs en matières actives prédites sont sous-estimées. La moyenne pour les valeurs prédites est de 187,3 % contre 239,7 % pour les valeurs de référence. De plus, on observe la teneur la plus faible à 115,2 % pour les valeurs prédites ce qui correspond à une semence bien dosée selon la norme du PSD, alors que pour les valeurs de référence, la plus faible teneur est surdosée à 143,7 % de la dose cible. De la même façon, on constate que la courbe de distribution du nombre de semences du set de prédiction est également décalée sous la droite, avec une moyenne de 187 % égale à la moyenne des valeurs prédites du set de calibration.

La **Figure 61** illustre les distributions des semences au sein de l'échantillon d'orge n° 74. Le modèle semble bien prédire les teneurs en matières actives puisque les trois distributions ont la même allure. Néanmoins, lorsque l'on regarde les valeurs moyennes, minimales et maximales, on constate que les valeurs prédites sont sous-estimées. La moyenne étant de 44,5 % pour les valeurs prédites et de 49,6 % pour les valeurs de référence, la teneur minimale respectivement de 8,5 % et de 23,1 % et la teneur maximale de 103,5 % et de 149,2 %. Cette sous-estimation entraîne que la semence mesurée en chromatographie comme surdosée, est bien dosée selon sa valeur prédite, et qu'en revanche, une semence bien dosée est prédite comme sous-dosée.

Les distributions des semences pour l'échantillon n° 75 d'orge, illustrées dans la **Figure 62**, sont également similaires pour les données de référence et les données prédites du set de calibration, avec une moyenne à 55,2 % pour les valeurs de référence et à 49,5 % pour les valeurs prédites avec un sous-dosage à 55,2 % pour les valeurs de référence et à 17,1 % pour les valeurs prédites. La courbe de distribution du nombre de semences du set de prédiction est aussi étalée que les courbes de calibration, avec une moyenne à 49 % de la dose cible.

N'ayant pas pu établir un modèle satisfaisant pour les semences d'épeautre. Les distributions au sein des échantillons ne sont pas illustrées.

### 2.3.2. Discussion

Les modèles de discrimination établis en tenant compte du spectre de chaque pixel, en plus de discriminer l'espèce de la semence et si celle-ci est traitée ou non, permettent de visualiser et d'estimer le pourcentage de zones traitées et non traitées au sein même d'une semence. En analysant les images, on constate que les semences d'épeautre sont particulièrement mal traitées. Ceci peut s'expliquer par la forme plus complexe empêchant les produits de s'y déposer aisément. Si le traitement n'est pas homogène sur la semence, cela implique qu'elle n'est pas non plus protégée homogènement.

Les analyses chromatographiques et spectroscopiques montrent que les 24 semences de chaque échantillon sélectionnées sur base de leur variabilité sont effectivement bien représentatives de la gamme de teneur en matières actives. On constate que pour les semences de blé et d'orge, les modèles de calibrations permettent d'estimer la teneur en matières actives par semence avec un  $R^2$  supérieur à 0,80. Néanmoins, comme on l'observait pour le dosage moyen des échantillons, le  $RPD_{cv}$  est trop faible que pour permettre une analyse quantitative. Les modèles permettent cependant d'avoir une idée de la distribution des matières entre les semences d'un même lot. En effet, les histogrammes montrent pour les échantillons de blé et d'orge que les courbes de distribution des valeurs de référence et des valeurs prédites en proche infrarouge ont une même allure malgré une sous-estimation des teneurs en matières actives prédites sur les semences d'orge. Ces résultats coïncident avec ceux d'une enquête réalisée au Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W) (Pigeon, 2003). Leurs modèles de calibration ont été établis avec 100 semences, et on observe que les  $RPD$  qu'ils obtiennent sont plus élevés que ceux de nos modèles, ce qui laisse penser que l'augmentation du nombre d'échantillons permettrait d'obtenir des  $RPD$  supérieurs à 3, permettant ainsi de classer les semences en trois groupes : bien dosées, sous-dosées et surdosées.

Les résultats des modèles sur les semences d'épeautre sont nettement moins bons. En effet, le  $R^2$  est de seulement 0,66 et les erreurs quadratiques moyennes très élevées, allant jusqu'à 33,94 pour le  $RMSECV$ . Ceci s'explique par l'hétérogénéité du traitement observable au sein d'une semence. Seules des zones des semences d'épeautre sont traitées. Par conséquent, lorsque l'analyse prend le spectre moyen de la semence, celui-ci est faussé puisqu'il fait la moyenne de zone traitées et non traitées.

Les résultats en dosage moyen et en dosage semence par semence en imagerie hyperspectrale présentent la même sensibilité. C'est un résultat très encourageant puisqu'O. Pigeon (2003) avait observé que la sensibilité de ses analyses en spectroscopie proche infrarouge classique avait tendance à baisser lors des analyses en semence par semence due aux faibles teneurs en matières actives. L'imagerie hyperspectrale serait donc une voie envisageable pour l'analyse de la qualité de traitement des semences.

## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Le traitement des semences permet une protection efficace des semences si il est appliqué à la dose cible et de manière homogène entre les semences d'un lot. Malgré une demande croissante de la part du producteur et de l'utilisateur, les contrôles de la qualité du traitement des semences sont rares dû au temps et au coût nécessaire à la méthode actuelle d'analyse. Le travail accompli a permis d'évaluer la qualité du traitement par le biais de trois méthodes de mesure : la chromatographie liquide à ultra performance, la spectroscopie proche infrarouge classique et l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge.

La première partie du travail consistait en une analyse des semences en dosage moyen. Le premier objectif était de créer des modèles permettant de discriminer les différentes espèces de semences, les semences traitées et non traitées, ainsi que les différents groupes de formulations. Nous avons pu montrer qu'il était possible de discriminer les espèces et les échantillons traités des non traités, aussi bien en SPIR avec le Bruker MPA qu'en imagerie avec le Burgermetrics line scan. Ces deux instruments sont capables, dans le meilleur des cas, de discriminer deux des trois groupes de formulations avec une sensibilité de 100 % pour le Bruker MPA et de 25 % et 93,7 % pour le Burgermetrics line scan. Il pourrait être intéressant de reconduire l'étude sur des échantillons parfaitement traités à la dose cible afin d'évaluer si la performance des modèles de discrimination peut être améliorée.

Le second objectif des analyses en dosage moyen était d'évaluer la variabilité de la teneur en matières actives entre les lots de semences. Nous avons constaté grâce aux analyses chromatographiques que la teneur moyenne dans un lot ne correspondait pas à la dose cible. Selon la norme du PSD, pour 54 % des échantillons traités avec la formulation Kinto Duo et 94 % avec le Redigo, la teneur en matière active est située au-delà des 30 % acceptables autour de la dose cible. Les modèles de calibration développés avec le Bruker MPA et le Burgermetrics line scan, ne permettent pas une analyse quantitative de ces teneurs en matières actives puisque malgré des  $R^2$  supérieurs à 0,8, les  $RPD_{cv}$  sont inférieurs à 5. Néanmoins, les résultats obtenus sont encourageants puisqu'on arrive à dégager des tendances. Dans certains cas, notamment pour la prédiction de la teneur totale en matières actives sur les semences d'orge, le  $RPD_{cv}$  de 2,5 permet de classer les lots de semences selon qu'ils sont sous-dosés ou surdosés. Il semble intéressant de poursuivre les analyses en réalisant de nouvelles équations basées sur un plus grand nombre d'échantillons et en se concentrant sur une espèce et une variété. De plus, l'utilisation de semences traitées sous condition de laboratoire avec des concentrations croissantes en matières actives permettrait d'améliorer la performance des équations de calibration.

Le troisième objectif était de comparer les résultats obtenus entre le Bruker MPA et le Burgermetrics line scan. L'analyse des spectres a permis de montrer que les profils spectraux obtenus à partir des deux instruments étaient similaires. Les analyses exploratoires ont également montré que les loadings étaient les mêmes. Néanmoins, la sensibilité des modèles développés à partir des spectres acquis par le Bruker MPA est meilleure que pour le Burgermetrics line scan. En effet, pour la discrimination des semences traitées et non traitées, la sensibilité est de 100 % pour le Bruker MPA alors qu'elle varie entre 83,3 et 96,3 % pour le Burgermetrics line scan. Les résultats des analyses de calibration sont également comparables entre les deux instruments. En appliquant les modèles généraux du Bruker MPA établis pour l'orge sur base de la teneur totale en matières actives des deux formulations, Kinto Duo et Redigo, on constate une surestimation de la teneur en

matières actives pour le Redigo par rapport aux valeurs de référence. Pour le modèle établi sur les spectres moyens du Bruker MPA et appliqué uniquement aux semences traitées avec le Redigo, seulement 60 % des échantillons sont détectés mal dosés contre 100 % avec la méthode de référence. Pour le même modèle établi sur les 3 spectres, 73 % des échantillons d'orge traité au Redigo sont détectés mal dosés. Pour les mêmes échantillons, le Burgermetrics line scan est capable de prédire 100 % des lots de semences mal dosés en prenant les spectres moyens et 87 % en prenant les 8 spectres par échantillon. Pour les deux instruments, la teneur en matières actives du Kinto Duo est systématiquement sous-dosée. Ces résultats suggèrent qu'une séparation de ces modèles en deux, un pour la teneur en Kinto Duo et un pour la teneur en Redigo, offrirait de meilleurs résultats pour autant qu'un nombre plus important d'échantillons soit disponible pour développer les modèles.

Les résultats d'analyse des semences en dosage moyen montrent une grande hétérogénéité de traitement entre lots de semences traitées avec une même formulation issus de différents producteurs de semences.

Pour l'analyse en semence par semence, le premier objectif était d'évaluer l'homogénéité du traitement au sein d'une semence en identifiant les zones non traitées. Nous avons pu montrer que l'imagerie hyperspectrale était capable de donner une estimation du pourcentage de la semence n'étant pas traitée et d'identifier ces zones sur une image.

Le second objectif spécifique au dosage en semence par semence était d'évaluer l'homogénéité de traitement entre les semences en déterminant la distribution des teneurs en matières actives sur les semences d'un même lot. Les analyses chromatographiques ont montré que le pourcentage de semences mal dosées dans un lot est considérable. Pour les échantillons de blé, d'orge et d'épeautre, on observe respectivement jusqu'à 100 %, 87,5 % et 75 % des semences mal dosées. De plus les coefficients de variations entre les semences d'un même lot sont nettement supérieurs aux 25 % préconisés par la norme du PSD. Par conséquent la distribution en matières actives au sein d'un lot est très hétérogène. Les résultats de prédiction des teneurs en matières actives sur les semences individuelles sont encourageants puisque les modèles sont capables de prédire les teneurs en matières actives avec un  $R^2$  supérieur à 0,8 pour les semences de blé et d'orge, même-ci les  $RPD_{cv}$  faibles ne permettent pas d'analyse quantitative. Ces modèles permettent néanmoins d'obtenir une distribution des matières actives entre les semences d'un lot, similaires à celle obtenue avec les valeurs de référence. Ils permettent également une bonne prédiction du pourcentage de semences mal dosées. Pour les échantillons de blé, le modèle détecte 20,8 % et 95,8 % de semences mal dosées contre 37,5 % et 100 % pour les analyses chromatographiques et pour les échantillons d'orge, le modèle détecte 87,5 % et 70,9 % de semences mal dosées contre 87,5 % et 79,2 % pour la méthode de référence.

En comparant les résultats obtenus, des différences sont observées entre les trois espèces. On constate d'une part que les échantillons de blé et d'orge sont ceux pour lesquels on détecte le plus de semences mal dosées, par exemple, pour les deux matières actives du Kinto Duo, 100 % des semences de l'échantillon 51 de blé sont surdosées, aussi bien par la méthode de référence que par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge. D'autre part, les échantillons d'épeautre présentent la plus grande variabilité entre les semences d'un même lot, avec des écarts-types pouvant atteindre 230 % de la dose cible en triticonazole pour l'échantillon n° 58 d'épeautre.

Les résultats d'analyse en semence par semence montrent une grande hétérogénéité de traitement entre semences traitées d'un même lot et au sein d'une semence.

Pour conclure, malgré la haute précision des méthodes chromatographiques permettant d'évaluer avec certitudes la qualité du traitement des semences, elles sont restreintes aux analyses en laboratoire. Ces méthodes sont longues, coûteuses et nécessitent une préparation parfois complexe des échantillons et l'utilisation de quantités importantes de solvant. Par conséquent les méthodes chromatographiques sont difficilement applicables sur une ligne de production qui requiert un instrument de contrôle direct et automatisable. Les résultats obtenus dans ce travail mettent en évidence le potentiel des méthodes de spectroscopie proche infrarouge comme alternative aux méthodes chromatographiques. La spectroscopie proche infrarouge classique et l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge sont capables par un dosage moyen, d'identifier l'espèce à laquelle appartient les semences du lot, si ce lot est traité ou non et de classer le lot en fonction du sur ou sous-dosage. Ces analyses sont rapides, non destructives et ne nécessitent pas l'utilisation de solvant, ce qui présente un intérêt considérable en industrie. Aussi, l'imagerie hyperspectrale pourrait être intégrée directement sur une ligne de production. Elle permettrait d'une part de déterminer dans un lot la présence d'un mélange d'espèces de semences de céréales, la présence de semences non traitées dans un lot traité mais également d'évaluer si le traitement est homogène entre les semences du lot.

Même si les modèles réalisés ne permettent pas encore de discriminer avec 100 % de certitude les groupes de formulations ni de prédire les teneurs en matières actives, les résultats sont encourageants. Aussi, d'autres études sont en cours au CRA-W sur les semences de betterave dont les résultats sont également prometteurs. L'amélioration de ces modèles permettrait à la spectroscopie proche infrarouge d'offrir des perspectives inédites pour l'industrie de la semence en permettant un contrôle des traitements pesticides qui pourrait donner vie à des normes garantissant une protection efficace des semences.

## VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Abou, C. (1993). *Les semences en voient de toutes les couleurs*. Biofutur, pp. 49-53.

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. (2003). *Principes généraux sur l'élaboration des évaluations globales du risque et de l'exposition*. Canada : agence de réglementation de la lutte antiparasitaire.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). (2014). *Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au rapport d'expertise collective de l'Inserm « Pesticides. Effets sur la santé »*. Moisons-Alfort.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). (2012). *Observatoire des résidus de pesticides*. En ligne, <http://www.afssa.fr/ET/PPR9445.htm?pageid=719&parentid=424>, consulté le 1 octobre 2014.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). (s.d.). *Observatoire des résidus de pesticides*. En ligne, <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr>, consulté le 14 mai 2015.

Alterre Bourgogne. (2009). *Pesticides au quotidien*. Rapport technique. Dijon : Alterre bourgogne. pp. 13-19.

Amvrazi, E.G., Tsiropoulos, N.G. (2008). *Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection*. Journal of chromatography A, 1216(14), pp. 2789-2797. Doi : 10.1016/j.chroma.2008.07.070

Association de surveillance de la qualité de l'air sur l'agglomération Bisontine et le sud Franche-Comté (ASQAB). (2005). *Les pesticides dans l'air franc-comtois : état des lieux, état des connaissances*. ASQAB.

Australian pesticides and veterinary medicines authority (APVMA). (2014). *Formulation types*. En ligne, <http://apvma.gov.au/node/10901>, consulté le 17 avril 2015.

Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). (2015). *Limites maximales de résidus*. En ligne, <http://www.efsa.europa.eu/fr/pesticides/mrls.htm>, consulté le 12 avril 2015.

Bakirci, G.T., Yaman Acay, D.B., Bakirci, F., Otles, S. (2014). *Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey*. Food chemistry, 160, pp.379-392.

Baldi, I., Lebailly, P., Rougetet, L., Dulaurent, S., Marquet, P. (2006). *Pesticide contamination of workers in vineyards in France*. Journal of exposure science & environmental epidemiology, 16(2), pp. 115-124.

Baldi, I., Mohammed Brahim, B., Brochard, P., Dartigues, J.F., Salamon, R. (1998). *Effets retardés des pesticides sur la santé : état des connaissances épidémiologiques*. Revue épidémiologique et santé publique, 46, pp. 134-142.

- Balland, B. (2007). *Optique géométrique : imagerie et instruments*. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes. pp. 66-67.
- Barriuso, E. (2003). *Estimation des risques environnementaux des pesticides*. Paris : INRA.
- BASF. (2015). *Protection des cultures*. En ligne, [http://www.agro.basf.be/agroportal/be/fr/m\\_crop\\_protection/CROP\\_PROTECTION\\_page.html](http://www.agro.basf.be/agroportal/be/fr/m_crop_protection/CROP_PROTECTION_page.html), Consulté le 3 août 2015.
- Batsch, D. (2011). *L'impact des pesticides sur la santé humaine*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy.
- Bayer. (2015). *Catalogue produits et semences : Redigo*. En ligne, <http://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/redigo/>, Consulté le 3 août 2015.
- Bengtson, H. (2010). *Lambert's Law of Solar Energy Absorption by Water*. En ligne, <http://www.brighthub.com/environment/renewable-energy/articles/79089.aspx>, consulté le 17 avril 2015.
- Bernard, A. (2014). *Toxicologie humaine et animale*. Document non publié, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve.
- Bertrand, D. (2002). *La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale*. Inra productions animales, 15(3), pp.209-219.
- Bertrand, D., Dufour, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Paris : Tec & doc.
- Beulin, X., Pinta, P., Ducroquet, D., Terrain, C. (2005). *Dossiers de la protection des semences*. En ligne, [http://controverses.sciences-po.fr/archive/pesticides/ProtSemences1\\_aout2005.pdf](http://controverses.sciences-po.fr/archive/pesticides/ProtSemences1_aout2005.pdf), consulté le 13 avril 2015.
- Boland, J., Koomen, I., Van Lidth de Jeude, J., Oudejans, J. (2004). *Les pesticides : composition, utilisation et risques*. Agrodok. pp 6-18.
- Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., Seta, N. (2006). *Pesticide exposure of non-occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: a French pilot study*. The science of the total environment, 366(1), pp. 74-91. Doi : 10.1016/j.scitotenv.2005.08.016
- Brandl, F. (2001). *Seed treatment technologies : evolving to achieve crop genetic potential. Seed treatment : Challenges and opportunities*. BCPC Symposium proceedings, 76, pp. 3-18.
- Bruker Optics. (2012). MPA Multi Purpose Analyzer. En ligne, [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-NIR/MPA/Flyers/MPA\\_Flyer\\_FR.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-NIR/MPA/Flyers/MPA_Flyer_FR.pdf), consulté le 22 juin 2015.
- Burns, D., Ciurczak, E. (2007). *Handbook of near-infrared analysis* (3<sup>e</sup> ed.). CRC press : Boca Raton, Floride.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.P., Coquet, Y. (2005). *Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales*. France Agricole. pp. 51-61 & 481-501.
- Chemisches und veterinaruntersuchungsamt Stuugardt (CVUA Stuttgart). (2011). *Quechers*. En ligne, <http://quechers.cvua-stuttgart.de>, consulté le 10 juin 2015.

- Chen, C., Qian, Y., Chen, Q., Tao, C., Li, C., Li, Y. (2011). *Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China*. Food control, 22(7), pp. 1114-1120. Doi : 10.1016/j.foodcont.2011.01.007
- Cheng, J.H., Sun, D.W., Pu, H., Zhu, Z. (2015). *Development of hyperspectral imaging coupled with chemometric analysis to monitor K value for evaluation of chemical spoilage in fish fillets*. Food Chemistry, 185, pp. 245-253. Doi : 10.1016/j.foodchem.2015.03.111
- Coignard, F., Lorente, C. (2006). *Exposition aérienne aux pesticides des populations à proximité de zones agricoles. Bilan et perspectives du programme régional intercirc*. France : Institut de veille sanitaire.
- Collaborative international pesticides analytical council (CIPAC). (1994). *CIPAC handbook volume F. Physico-chemical methods for technical and formulated pesticides*. England : Black bear press Ltd.
- Comité de la prévention et de la précaution. (2002). *Risques sanitaires liés à l'utilisation de produits phytosanitaires*. Paris : Comité de la prévention et de la précaution.
- Comité régional phyto. (s.d.). *Un pôle de concertation sur les pratiques phytosanitaires : législations*. En ligne, <http://www.crphyto.be/index.php?rub=espaces-vert-voiries&pg=legislations>, Consulté le 15 octobre 2014.
- Comité scientifique de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA). (2007). *Estimation de l'exposition de la population belge aux résidus de pesticides via la consommation de fruits et légumes - 2005*. En ligne, [http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/\\_documents/avis31-2007\\_fr\\_dossier2005-58\\_000.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/_documents/avis31-2007_fr_dossier2005-58_000.pdf), consulté le 15 février 2015.
- Commeau, M.F., Spire, M.L. (1996). *Technologies des semences : vocabulaire français-anglais-allemand*. Paris : INRA
- Commission du Codex alimentarius , Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. (1994). *Codex alimentarius : Vol. 4. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires*. Rome : Food and agriculture organization of the United Nation.
- Commission européenne. (2008). *Nouvelles règles concernant les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires*. Bruxelles, Commission européenne. Doi : 10.2772/13491
- CropLife foundation. (2013). *The role of seed treatment in modern U.S. crop production: a review of benefits*. Washington, Croplife foundation.
- Dayde, F. (2011). *Entreprise Europe Bourgogne : Le paquet pesticides*. Dossier septembre octobre novembre. Entreprise Europe.
- De Luca, M., Vallet, A., Borghi, R. (2007). *Contribution à la modélisation de la pulvérisation d'un liquide phytosanitaire en vue de réduire les pollutions*. Journée interdisciplinaire sur la qualité de l'air. Villeneuve d'Ascq.
- Department of chemistry and biochemistry. (2002). *Infrared spectroscopy: theory*. Syllabus, University of Colorado, Colorado.

Dhakal, S., Li, Y., Peng, Y., Chao, K., Qin, J., Guo, L. (2014). *Prototype instrument development for non-destructive detection of pesticide residue in apple surface using Raman technology*. Journal of food engineering, 123, pp. 94-103. Doi : 10.1016/j.jfoodeng.2013.09.025

Direction de l'Etat Environnement. (2012). *Les indicateurs clés de l'environnement wallon SPW-DGARNE-DEMNA-DEE*. p. 25.

Emans, H.J.B., Beek, M.A., Linders, J.B.H.J. (1992). *Evaluation system for pesticides (ESPE) 1. Agricultural pesticides*. Bilthoven : National institute of public health and environmental protection RIVM).

Encyclopédie de l'Agora. (2006). En ligne, <http://agora.qc.ca.>, consulté le 17 octobre 2014.

Engel, E., Ratel, J., Blinet, P., Chin, S.T., Rose, G., Marriott, P.J. (2013). *Benchmarking of candidate detectors for multiresidues analysis of pesticides by comprehensive two-dimensional gas chromatography*. Journal of chromatography A, 1311, pp. 140-184. Doi : 10.1016/j.chroma.2013.08.011

European Commission. (1978). Council Directive 79/117/EEC of 21 December 1978 prohibiting the placing on the market and use of plant protection products containing certain active substances. Official journal of the European Union L 033, pp. 36-40.

European Commission. (1991). Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official journal of the European Union L 230, pp. 1-32.

European Commission. (1998). Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. Official journal of the European Union L 123, pp.1-63.

European Commission. (2005). *Consumption of pesticides : Share of different types of pesticides in total sales of pesticides in selected countries*. Eurostat. En ligne, [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php/File:Consumption\\_of\\_pesticides\\_-\\_Share\\_of\\_different\\_types\\_of\\_pesticides\\_in\\_total\\_sales\\_of\\_pesticides\\_in\\_selected\\_countries\\_2005.png](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/File:Consumption_of_pesticides_-_Share_of_different_types_of_pesticides_in_total_sales_of_pesticides_in_selected_countries_2005.png), consulté le 6 novembre 2015.

European Commission. (2009). Directive 2009/127/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 amending Directive 2006/42/EC with regard to machinery for pesticide application. Official journal of the European Union L 310, pp. 29-33.

European Commission. (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Official journal of the European Union L 309, pp. 71-86.

European Commission. (2009). Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official journal of the European Union L 309, pp. 1-50.

European Commission. (2009). Regulation (EC) No 1185/2009 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2009 concerning statistics on pesticides. Official journal of the European Union L324, pp. 1-22.

European Commission. (2012). Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Text with EEA relevance. Official journal of the European Union L 167, pp. 1-123.

European Commission. (2015). *MRLs for product*. En ligne, [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=product.resultat&language=EN&selectedID=240](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=product.resultat&language=EN&selectedID=240), consulté le 8 avril 2015.

European food safety authority panel on plant protection products and their residues (EFSAPPR). (2010). *Scientific opinion on preparation of a guidance document on pesticide exposure assesment for workers, operators, bystanders and residents*. EFSA journal, 8(2), pp. 28-33. Doi : 10.2903/j.efsa.2010.1501

Farm chemical international (FCI). (2015). *Crop protection database*. En ligne, <http://www.farmchemicalsinternational.com/crop-protection-database>, Consulté le 3 août 2015.

Farré, M., Martinez, E., Barcelo, D. (2008). Technique de détermination de composés organiques dans l'environnement. Barcelone : Technique de l'ingénieur.

Fatela, L. (2012). *Utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme un outil PAT pour la quantification de substances en solution*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de pharmacie de Grenoble, Grenoble.

Fenske, R.A. (1990). *Nonuniform dermal deposition patterns during occupational exposure to pesticides*. Archives of environmental contamination and toxicology, 19(3), pp. 332-337.

Fernandez Alba, A.R. (2008). *Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation product in food by advanced LC-MS*. TrAC trends in analytical chemistry, 27(11), pp. 973-990. Doi : 10.1016/j.trac.2008.09.009

Fernandez Pierna, J.A., Vincke, D., Dardenne, P., Yang, Z., Han, L., Baeten, V. (2014). *Line scan hyperspectral imaging spectroscopy for the early detection of melamine and cyanuric acid in feed*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 22, pp.103. Doi : 10.1255/jnirs.1109

Fillatre, Y. (2011). *Produits phytosanitaire : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem*. Thèse de doctorat en chimie analytique non publiée, Université d'Angers, Angers.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1995). *Manual on the development and use of FAO specifications for plant protection products*. Rome : Food and agriculture organization of the United Nation.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2009). *How to feed the world in 2050*. En ligne, [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf), consulté le 6 avril 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). *Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides*. Rome. p. 7.

Gatignol, C., Étienne, J.C. (2010). *Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologique: Rapport sur pesticides et santé*. France : Assemblée nationale.

- Gillet, S. (2010). *La spectroscopie*. Syllabus. En ligne, <http://perso.latrimbu.com/shagar/steve/pdf/spectro3BBM.pdf>, consulté le 28 mai 2015.
- Golge, O., Kabak, B. (2015). *Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes*. Food chemistry, 176, pp. 319-332. Doi : 10.1016/j.foodchem.2014.12.083
- Graillot, V. (2012). *Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité*. Thèse de doctorat en pathologie, toxicologie, génétique et nutrition non publiée, Université Toulouse III, Toulouse.
- Grange, D., Camard, J.P., Host, S., Grémy, I. (2008). *Les pesticides : considérations sanitaires*. Paris : Observatoire régional de santé d'Ile-de-France.
- Gratien, E. (2008). *Spectroscopie ultraviolet-visible et infrarouge de molécules clés atmosphériques*. Thèse de doctorat en sciences de l'univers et de l'environnement non publiée, Université de sciences et technologies, Paris.
- He, L.; Chen, T.; Labuza, T.P. (2014). *Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy*. Food, Chemistry, 148, pp. 42-46. Doi : 10.1016/j.foodchem.2013.10.023.
- Hladik, M., Kolpin D., Kuivila, K. (2014). *Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA*. Environmental pollution, 193, pp. 189-196. Doi : 10.1016/j.envpol.2014.06.033
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). (2013). *Pesticides : effets sur la santé*. Collection expertise collective. Paris : INSERM. pp. 1-22.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). (2008). *Cancers et environnement*. Collection expertise collective. Paris : INSERM.
- ISO. (1994). *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1 : Principes généraux et définitions*. ISO 5725-1, pp. 1-18.
- Jansson, C., Pihlstrom, T., Osterdahl, B.G., Markides, K.E. (2004). *A new multi-residue method for analysis of pesticide residue in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. Journal of chromatography A, 1023(1), pp 93-104. Doi : 10.1016/j.chroma.2003.10.019
- Jardim, A.N., Wello, D.C., Goes, F.C., Junior, E.F., Caldas, E.D. (2014). *Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- $\mu$ ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment*. Food chemistry, 164, pp. 195-204. Doi : 10.1016/j.foodchem.2014.05.030
- Johnson, W.A. (2003). *Invitation à la chimie organique*. Paris : De Boeck Diffusion. (Œuvre originale publiée en 1999).
- Koinecke, A., Kreuzin, R., Bahadir, M., Siebers, J., Botling, H.G. (1994). *Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials*. Fresenius journal of analytical chemistry, 349(4), pp. 301-305. Doi : 10.1007/BF00323208

- Kolberg, D.J., Prestes, O.D., Adaime, M.B., ZEnella, R. (2011). Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains , four and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. *Food chemistry*, 125, pp. 1436-1442. Doi : 10.1016/j.foodchem.2010.10.041
- Larkin, P.J.(2011) *IR and Raman spectroscopy : principles and spectral interpretation*. San Diego: Elsevier.
- Larousse (2015). En ligne, <http://www.larousse.fr>, consulté le 30 octobre 2014.
- Leenders, M., Boshuizen, H.C., Ferrar,i P., Siersema, P.D., Overvad, K., Tjønneland, A., Olsen, A., Boutron-Ruault, M.C., Dossus, L., Dartois, L., Kaaks, R., Li, K., Boeing, H., Bergmann, M.M., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Krogh, V., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Peeters, P.H., Weiderpass, E., Engeset, D., Braaten, T., Redondo, M.L., Agudo, A., Sánchez, M.J., Amiano, P., Huerta, J.M., Ardanaz, E., Drake, I., Sonestedt, E., Johansson, I., Winkvist, A., Khaw, K.T., Wareham, J., Key, T.J., Bradbury, K.E., Johansson, M., Licaj, I., Gunter, M.J., Murphy, N., Riboli, E., Bueno-de-Mesquita, H.B (2014). *Fruit and vegetable intake and cause-specific mortality in the EPIC study*. *European journal of apidemiology*, 29(9), pp. 639-652. Doi : 10.1007/s10654-014-9945-9
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwt, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N. (2010). *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables*. *Journal of chromatography A*, 1217(16), pp. 2548-2560. Doi : 10.1016/j.chroma.2010.01.044
- Liu, B., Han, G., Zhang, Z., Liu, R.; Jiang, C., Wang, S., Han, M.Y. (2012). *Shell Thickness-Dependent Raman Enhancement for Rapid Identification and Detection of Pesticide residues at Fruit peels*. *Analytical chemistry*, 84(1), pp. 255-261. Doi : 10.1021/ac202452t
- Liu, S., Zheng, Z., Li, X. (2012). *Advances in pesticide biosensors : current status, challenges, and future perspectives*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(1), pp. 63-90. Doi : 10.1007/s00216-012-6299-6
- Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R.A., Barr, D.B., Bravo. R. (2006). *Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides*. *Environmental health perspectives*, 114(2), pp. 260-263. Doi : 10.1289/ehp.8418
- Maciejewski, J. (2013). *Semences et plants*. *Agriculture d'aujourd'hui*. Paris : Tec & doc. pp. 139-154.
- Matthews, G.A., Thornhill, E.W. (1966). *Matériel d'application des pesticides à usage agricole*. Bulletin des services agricoles de la FAO 112/1. Rome : Food and agriculture organization of the United Nation.
- Mendham, J., Denney, R.C., Varnes, J., Thomas, M. (2006). *Analyse chimique quantitative de vogel*. Bruxelles : De boek. (Œuvre originale publiée en 2000).
- Merhi, M. (2008). *Étude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin*. Thèse de doctorat en phathologie, toxicologie, génétique et nutrition non publiée, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse.

- Moreau, J.P. (1991). La protection des cultures, les pesticides et l'environnement. *Courrier de la cellule environnement de l'INRA*, 14, pp. 43-47.
- Morgan, M.K., Shldon, L.S., Croghan, C.W., Jones, P.A., Robertson, G.L., Chang, J.C, Wilson, N.K., Lyu, C.W. (2005). *Exposure of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in their everyday environments*. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*, 15(4), pp. 297-309. Doi : 10.1038/sj.jea.7500406
- Multigner, L. (2005). *Effets retardés des pesticides sur la santé humaine*. *Environnement, risques, santé*, 4(3), pp. 187-194.
- Murray, I. (2015). *Introduction to near infrared spectroscopy*. Communication présentée à la formation Spectroscopy and Chemometrics, Gembloux.
- Ndao, T. (2008). *Étude des principaux paramètres permettant une évaluation et une réduction des risques d'exposition des opérateurs lors de l'application de traitement phytosanitaires en culture maraîchère et cotonnière au Sénégal*. Thèse de doctorat en science agronomiques et ingénierie biologique non publié, Faculté universitaire des sciences agronomiques, Gembloux.
- Nicolai, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J. (2007). *Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review*. *Postharvest biology and technology*, 46(2), pp. 99-118. Doi : 0.1016/j.postharvbio.2007.06.024
- Oerke, E.C. (2005). *Crop losses to pests*. *The journal of agricultural science*, 144(01), pp. 31-43. Doi : 10.1017/S0021859605005708
- Ogata, N., Vogler, S.M., Narahashi, T. (1998). *Lindane but not deltamethrin blocks a component of GABA-activated chloride channels*. *The FASEB journal*, 2(13), pp. 2895-2900.
- Onil, S., Louis, S.L. (2001). *Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère*. Guide technique. Montréal : Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). (2008). *La performance environnementale de l'agriculture dans les pays de l'OCDE depuis 1990*, OECD. pp. 70-75.
- Organisation mondiale de la santé (OMS). (1997). *Guide pour le calcul prévisionnel des quantités de résidus de pesticides apportées par l'alimentation (révision)*. Suisse.
- Osborne, B.G., Fearn, T. (1986). *Near infrared spectroscopy in food analysis*. New York: Longman scientific & Technical. pp. 36-40.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with application in food and beverage analysis*. London : Longman scientific & technical.
- Oyebode, O., Grodon Dseagu, V., Walker, A., Mindell, J.S. (2014). *Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data*. *Journal of epidemiology community health*, 68(9), pp. 856-862. Doi : 10.1136/jech-2013-203500
- Pesticide Safety Directorate (PSD). (2000). *Seed treatment : Efficacy and physical/mechanical data requirements*. Efficacy Guideline 2008.
- Pigeon, O. (2003). *Étude de la qualité des traitements des semences avec des produits phytopharmaceutiques par la spectrométrie dans le proche infrarouge*. Thèse de doctorat en

chimie analytique et phytopharmacie, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Gembloux.

Pigeon, O., Dardenne, P., Sinnaeve, G., De vos, P. (2004). *Quality control of seed treatments using near infrared spectroscopy*.

Pigeon, O., Proft, M., Ryckel, B., Ducas, N., Vos, P., Dardenne, P., Billen, P., Dotreppe, O. (2000). *Determination of imidacloprid on barley seeds by near infrared spectroscopy*. Medelingen faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen, 65(2), pp. 379-392.

Pimentel, D., Levitan, L. (1986). *Pesticides : amounts applied and amounts reaching pests*. Bioscience, 36, pp 86-91.

Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, W.J., Graap, S., Keeton, W.S., Selig, G. (1993). *Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture*. Agriculture, ecosystems & environment, 44(1-4), pp. 273-288. Doi : 10.1016/0167-8809(93)90030-S

Popp, J., Peto, K., Nagy, J. (2013). Impact of pesticide productivity on food security. In E. Lichtfouse (Ed), Sustainable agriculture reviews. London :Springer. pp.19-34. Doi : 10.1007/978-3-319-00915-5

Prouvost, E., Declercq, C. (2005). *Exposition de la population aux pesticides dans la région Nord-Pas –de-Calais : apports du programme PHYTO AIR*. Lille : Observatoire régional de la santé Nord-Pas-de-Calais.

Rensing, C., Sztor, E. (1992). *Les techniques d'enrobage et de pelliculage. Évolution des traitements de semences*. Phytoma, la défense des végétaux, 441, pp. 16-20.

Santé public fédéral, Sécurité de la chaîne alimentaire et environnement. (2015). Paradoxe du DDT : *entre toxicité environnementale et protection de la santé publique*. En ligne, <http://health.belgium.be/eportal/Environment/Chemicalsubstances/PersistentOrganicPollutants/RealScenarios/ParadoxOfDDT/19088538?ie2Term=pesticide?&fodnlang=fr#.VZD6-E8w-70>, consulté le 29 juin 2015.

Saptari, V. (2003). *Fourier-Transform Spectroscopy Instrumentation Engineering*. Washington : The international society for optical engineering

Sayen, S., Guillon, E. (2010). Transfert des produits phytosanitaires : du sol à l'eau. In J.P. Brossard, M. Defranceschi & P. Hervé (Eds.). *Chimie des milieux complexes*. Techniques ingénieur. pp. 3-6

Schiffers, B. (2014). *Risques liés aux résidus de pesticides*. Document non publié, Gembloux agro-bio Tech, Gembloux.

Schiffers, B., Fraselle, J. (1988). *Le point sur les techniques de traitement des semences*. Gembloux : Unité de phytopharmacie faculté des sciences agronomiques de Gembloux.

Semal, J. (1982). *Phytopathologie et géopolitique*. La maison rustique, Paris.

Service public fédéral (SPF), Sécurité de la chaîne alimentaire et environnement. (s.d.). En ligne, [www.fytoweb.fgov.be](http://www.fytoweb.fgov.be), consulté le 29 juin 2015.

Service publique de Wallonie. (s.d.). *Portail de l'agriculture wallonne : Programme wallon de réduction des pesticides*. En ligne,

- [http://agriculture.wallonie.be/apps/spip\\_wolwin/article.php3?id\\_article=397](http://agriculture.wallonie.be/apps/spip_wolwin/article.php3?id_article=397), Consulté le 8 octobre 2014.
- Severn, D.J., Ballard, G. (1990). Risk / Benefit and regulation. In H. Cheng (Ed), *Pesticides in the soil environment : processes, impacts, and modeling*. Madison : Soil science society of America. pp. 467-491.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (2002). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. Germany : Wiley VCH.
- Simonian, A.L., Efremenko, E.N., Wild, J.R. (2001). *Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples*. *Analytica chimica acta*, 444(2), pp. 179-186. Doi : 10.1016/S0003-2670(01)01099-6
- Slowik Borowiec, M., Szyrka, E., Walorczyk, S. (2014). *Gas chromatographic determination of pesticide residues in white mustard*. *Food chemistry*, 173, pp. 997-1005. Doi : 10.1016/j.foodchem.2014.06.125
- Socrates, G. (1995). *Infrared characteristic group frequencies : tables and charts (2<sup>e</sup>ed.)*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd. pp. 203-204.
- Specim. (2013). Specim, making spectral imaging possible. Document non publié, Centre wallon de recherche agronomique de Gembloux, Gembloux.
- Stajnbaher, D., Zupancic Kralj, L. (2003). *Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of chromatography A*, 1015(1-2), pp. 185-198. Doi : 10.1016/S0021-9673(03)01211-1
- Suett, D.L., Hewett, P.J., Jukes, A.A., Morgan, L., fox, V. (1994). *The ethirimol content of commercially treated cereal seeds*. *Seed treatment : Progress and prospects*, BCPC monograph, 57, pp. 397-402.
- Szymanski, H.A. (1966). *IR: Theory and practice of infrared spectroscopy*. New-York : Plenum press.
- Tadeo, J.L. (2008). *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. CRC press : Boca Raton, Floride.
- Taillet, R., Villain, L., Febvre, P. (2009). *Dictionnaire de physique*. Bruxelles, De Boeck.
- Tekrony, D.M. (2005). *Applicator training manual for : seed treatment pest control*. Kentucky : UK cooperative extension service.
- Teye, E., Huang, X.Y., Afoakwa, N. (2013). *Review on the potential Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the Measurement of Chemical Residues in Food*. *American journal of food science and technology*, 1(1), pp. 1-8. Doi : 10.12691/ajfst-1-1-1
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. IUPAC. Technical report. *Pure and Applied Chemistry*, 75(5), pp. 835-855. Doi : 10.1351/pac200274050835
- Tissut, M., Séverin, F., Benoît-Guyod, J. L. (1979). *Les pesticides oui ou non ?* Grenoble : Presse universitaire de Grenoble. pp. 45-199.

- Tomlin, C.D.C. (2000). *The pesticide manual: a world compendium*. Farnham : British crop protection council.
- Topuz, S., Ozhan, G., Alpertunga, B. (2005). *Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD*. Food control, 16(1), pp. 87-92. Doi : 10.1016/j.foodcont.2003.11.012
- Torres, C.M., Pico, Y., Maries, J. (1996). *Determination of pesticide residues in fruit and vegetables*. Journal of chromatography A, 754(1-2), pp. 301-331. Doi : 10.1016/S0021-9673(96)00407-4
- Turner, M. (2013). *Les semences*. Gembloux : Press agronomiques de Gembloux. (œuvre originale publiée en 2010).
- U.S. Congress, Office of technology assessment. (1988). *Pesticide residues in Food : technologies for detection*. Washington, Government printing office.
- Uneke, C.J. (2007). *Integrated pest management for developing countries : a systematic overview*. Nova Science Pub Inc. pp. 32-35.
- University of Hertfordshire. (2015). PPDB: Pesticide properties database. En ligne, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/>, Consulté le 3 aout 2015.
- Van der Maas, J.H. (1972). *Basic infrared spectroscopy*. London : Heyden & son LTD.
- Van der Marl, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., Vermeulen, R. (2011). *Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results*. Environ health perspect, 120(3), pp. 340-347. Doi : 10.1289/ehp.1103881
- Van der Werf, H. M.G. (1997). *Évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement*. (Elsevier Science-NI, trad.). Colmar : INRA. (Œuvre originale publiée en 1996).
- Vandeginste, B. (1998). Handbook of chemometrics and qualimetrics : Part B in Vandeginste, B., Massart, D.L., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. (Eds.), *Data handling in science and technology*, 20(2) pp. 349-379. Amsterdam: Elsevier science.
- Vermeulen, P., Fernandez Perna, J.A., Egmond, H.P., Dardenne, P., Baeten, V. (2012). *Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using near infrared hyperspectral imaging*. Food Additives et Contaminants: Part A, 29, pp.232–240. Doi : 10.1080/19440049.2011.627573
- Vinson, F., Merhi, M., Baldi, I., Raynal, H., Gamet Payrastre, L. (2011). *Exposure to pesticides and risk of childhood cancer : a meta-analysis of recent epidemiological studies*. Occupational and environmental medicine, 68(9), pp. 694-702. Doi : 10.1136/oemed-2011-100082
- Wang, X., Du, Y., Zhang, H., Xu, Y., Pan, Y., Wu, T., Hu, H. (2014). *Fast enrichment and ultrasensitive in-situ detection of pesticide residues on oranges with surface-enhanced Raman spectroscopy based on Au nanoparticles decorated glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate material*. Food control, 46, pp. 108-114. Doi : 10.1016/j.foodcont.2014.04.035
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., Hu, F.B. (2014). *Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies*. BMJ (Clinical research edition), 349. Doi : 10.1136/bmj.g4490.
- Watanabe, E., Kobara, Y., Baba, K., Eun, H. (2014). *Aqueous acetonitrile extraction for pesticide residue analysis in agricultural products with HPLC-DAD*. Food chemistry, 154, pp.7-12. Doi : doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.075

- Waters. (2015). Système ACQUITY UPLC. En ligne, [http://www.waters.com/waters/fr\\_FR/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?locale=fr\\_FR&cid=514207#Caract%C3%A9ristiques](http://www.waters.com/waters/fr_FR/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?locale=fr_FR&cid=514207#Caract%C3%A9ristiques), Consulté le 16 juin 2015.
- Weisstein, E.W. (2007). Books about Fourier Transform Spectroscopy. En ligne, <http://scienceworld.wolfram.com/physics/FourierTransformSpectrometer.html>, Consulté le 14 avril 2016.
- Westwood, F., Bean, K.M., Dewar, A.M. (1994). *The effect of pellet weight on the distribution of imidacloprid applied to sugar-beet pellets*. Seed treatment : Progress and prospects, BCPC monograph, 57, pp. 403-408.
- Whyatt, R.M., Rauh, V., Barr, D.B., Camann, D.E., Andrews, H.F., Garfinkel, R., Hoepner, L.A., Biaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., Tang, A., Kinney, P.L., Perera, F.P. (2004) *prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort*. Environ health perspect, 112, pp. 1125-1132. Doi : 10.1289/ehp.6641
- Wilkowaska, A., Biziuk, M. (2011). *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. Food chemistry, 125(3), pp. 803-812. Doi : 10.1016/j.foodchem.2010.09.094
- Williams, P. (2014). *The RPD statistics: a tutorial note*. NIR news, 25(1), pp. 22. Doi : 10.1255/nirn.1419
- Wilson, R.H. (1994). *Spectroscopic techniques for food analysis*. London Colney, Wilson.
- Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M., Windig, W., Koch, R.S. (2006). PLS Toolbox 4.0 for use with MATLAB™. Wenatchee: Eigenvector Research.
- Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Szinicz, L. (2002). *Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates*. Archives of toxicology, 76(9), pp. 523-529.
- World Health Organization, United Nations Environment Programme. (1991). *L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique*. Genève : Organisation mondiale de la Santé. pp. 11-50.
- Yang, M., Wang, L. (2008). *Advances in techniques on analysis and removal of pesticide Residues in traditional Chinese herbal medicines*. World science and technology, 10(1), pp. 107-112. Doi : 10.1016/S1876-3553(09)60005-3
- Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y.C., Dong, A.J., Zhao, H.T., Sun, C.H., Cui, L. (2011). *Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS*. Food chemistry, 127(2), pp. 855-865. Doi : 10.1016/j.foodchem.2011.01.024
- Zhang, M.H., Luypaert, J., Fernandez Pierna, J.A., Xu, Q.S., Massart, D.L. (2004). *Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration*. Talanta, 62(1), pp. 25-35. DOI : 10.1016/S0039-9140(03)00397-7
- Zhang, P.X., Zhou, X., Cheng, A.Y.S., Fang, Y. (2006). *Raman Spectra from Pesticides on the Surface of Fruits*. Journal of physics : Conference series, 28(7), pp. 7-11. Doi : 10.1088/1742-6596/28/1/002.

Zhang, W., Jiang, F., Ou, J. (2011). *Global pesticide consumption and pollution :with China as focus*. Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences, 1(2), pp 125-144.

Zhang, W., Pan, L., Tu, S., Zhan, G., Tu, K. (2015). *Non-destructive internal quality assessment of eggs using a synthesis of hyperspectral imaging and multivariate analysis*. Journal of food engineering, 157, pp. 41-48. Doi : 10.1016/j.jfoodeng.2015.02.013

## VII. ANNEXES

### Annexe 1 : Tableaux descriptifs des échantillons de blé, d'orge et d'épeautre.

Tableau 27 : Descriptions des échantillons de blé.

N°	Traitement	Groupe de formulation	Kinto Duo				Redigo	
			Prochloraz		Triticonazole		Prothioconazole	
			g/100 kg	% cible	g/100 kg	% cible	g/100 kg	% cible
1	Redigo	2	ND		ND		5,66	57
2	Redigo	2	ND		ND		6,08	61
3	Redigo*	2	6,30	52,0	2,47	62	4,51	45
4	Redigo Deter	2						
5	Beret Gold	3						
6	Celest gold	3						
7	Beret Gold	3						
8	Redigo	2	ND		ND		4,94	49
9	Redigo	2	ND		ND		5,00	50
10	Redigo	2	ND		ND		6,43	64
11	Redigo	2	ND		ND		5,13	51
12	Redigo	2	ND		ND		6,03	60
13	Redigo	2	ND		ND		4,72	47
14	Celest	3						
15	Celest	3						
16	Celest	3						
17	Kinto Duo	1	13,60	113	5,13	128	ND	
18	Redigo	2	ND		ND		6,68	67
19	Kinto Duo	1	9,85	82	5,51	138	ND	
20	Kinto Duo	1	14,59	122	3,83	96	ND	
21	Redigo	2	ND		ND		7,73	77
22	Redigo	2	ND		ND		4,50	45
23	Kinto Duo	1	11,66	97	6,24	156	ND	
24	Kinto Duo	1	0,48	4	2,62	66	ND	
25	Redigo	2	ND		ND		5,56	56
26	Redigo	2	ND		ND		2,44	24
27	Vibrance Gold	3						
28	NaN							
29	Redigo Deter	2						
30	Celest gold net	3						

31	Redigo+Gaucho350+ Langis	2						
32	Vibrance gold	3						
33	Kinto Duo*	1	0,41	3	ND		5,03	50
34	Celest gold net	3						
35	Celest gold net	3						
36	Kinto Duo*	1	12,65	105	4,40	110	2,20	22
37	Redigo	2	ND		ND		13,74	137
38	Kinto Duo*	1	0,37	3	4,31		1,63	16
39	Kinto Duo*	1	15,39	128	5,18	129	2,94	29
40	Kinto Duo*	1	ND		6,37	159	1,87	19
41	Redigo	2	ND		ND		2,43	24
42	Celest	3						
43	Kinto Duo*	1	ND		4,83	121	ND	
44	Kinto Duo*	1	ND		ND		2,35	23
45	Kinto Duo*	1	0,41	3	ND		3,72	37
46	Beret Gold	3						
47	Kinto Duo*	1	ND		ND		11,05	110
48	Redigo	2	ND		ND		4,75	48
49	Redigo+Gaucho350+ Langis	2						
50	Kinto Duo*	1	ND		ND		1,66	17
51	Kinto Duo	1	29,73	248	9,65	241	ND	
52	Kinto Duo*	1	ND		ND		2,40	24
53	Kinto Duo*	1	0,52	4	ND		6,05	61
54	Kinto Duo*	1	11,64	97	ND		6,25	62
55	Kinto Duo*	1	11,02	92	ND		6	60
56	Redigo+Gaucho350+ Langis	1						
82	Non traité							
83	Non traité		ND		ND		ND	
84	Non traité							

Le tableau reprend pour tous les échantillons de blé, le numéro de l'échantillon (N°), le traitement avec lequel il a été traité ou non traité s'il n'a pas reçu de traitement et le groupe de formulation auquel la formulation appartient. Le tableau reprend également les résultats chromatographiques du dosage moyen effectué pour les semences traitées au Kinto duo et au Redigo. Les résultats du dosage moyen sont exprimés g de matières actives pour 100 kg de semence et en pourcentage de la dose cible. Le prochloraz et le triticonazole sont les matières actives du Kinto Duo et le prothioconazole la matière active du Redigo. Le traitement de l'échantillon n° 28 (NaN) n'était pas indiqué. Les traitements qui sont suivis d'une \* sont ceux dont les valeurs chromatographiques ont révélées qu'ils n'étaient pas traités le traitement indiqué. ND = non détecté.

Tableau 28 : Descriptions des échantillons d'orge.

N°	Traitement	Groupe de formulation	Kinto Duo				Redigo	
			Prochloraz		Triticonazole		Prothioconazole	
			g/100kg	% cible	g/100kg	% cible	g/100kg	% cible
62	Landor ct	3						
63	Landor ct	3						
64	Landor ct	3						
65	Landor ct	3						
66	Landor ct	3						
67	Landor ct	3						
68	Redigo	2	ND		ND		6,24	62
69	Vibrance gold	3						
70	Vibrance gold	3						
71	Redigo	2	ND		ND		3,42	34
72	Redigo	2	ND		ND		6,69	67
73	Kinto Duo*	1	7,03	59	4,15	104	3,90	39
74	Kinto Duo	1	8,03	67	2,84	71	ND	
75	Kinto Duo	1	8,12	68	4,66	117	ND	
76	Redigo	2	ND		ND		5,96	60
77	Redigo Deter	2						
78	Redigo	2	ND		ND		3,76	38
79	Argento	2						
80	Non traité							
81	Non traité		ND		ND		ND	
85	Non traité							

Le tableau reprend pour tous les échantillons de blé, le numéro de l'échantillon (N°), le traitement avec lequel il a été traité ou non traité s'il n'a pas reçu de traitement et le groupe de formulation auquel la formulation appartient. Le tableau reprend également les résultats chromatographiques du dosage moyen effectué pour les semences traitées au Kinto duo et au Redigo. Les résultats du dosage moyen sont exprimés g de matières actives pour 100 kg de semence et en pourcentage de la dose cible. Le prochloraz et le triticonazole sont les matières actives du Kinto Duo et le prothioconazole la matière active du Redigo. Les traitements qui sont suivis d'une \* sont ceux dont les valeurs chromatographiques ont révélées qu'ils n'étaient pas traités le traitement indiqué. ND = non détecté.

Tableau 29 : Descriptions des échantillons d'épeautre.

N°	Traitement	Groupe de formulation	Kinto Duo				Redigo	
			Prochloraz		Triticonazole		Prothioconazole	
			g/100kg	% cible	g/100kg	% cible	g/100kg	% cible
57	Kinto Duo	1	22,41	187	12,20	305	ND	
58	Kinto Duo	1	18,52	154	6,62	165	ND	
59	Non traité							
60	Kinto Duo	1	21,28	177	7,56	189	ND	
61	Non traité		ND		ND		ND	

Le tableau reprend pour tous les échantillons de blé, le numéro de l'échantillon (N°), le traitement avec lequel il a été traité ou non traité s'il n'a pas reçu de traitement et le groupe de formulation auquel la formulation appartient. Le tableau reprend également les résultats chromatographiques du dosage moyen effectué pour les semences traitées au Kinto duo et au Redigo. Les résultats du dosage moyen sont exprimés g de matières actives pour 100 kg de semence et en pourcentage de la dose cible. Le prochloraz et le triticonazole sont les matières actives du Kinto Duo et le prothioconazole la matière active du Redigo. ND = non détecté.

## Annexe 2 : Résultats des analyses chromatographiques en semence par semence

Tableau 30 : Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 20 de blé.

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
3	9,32	4,04
7	8,10	3,08
12	7,30	2,99
14	13,84	5,88
16	8,48	3,33
25	11,45	4,75
35	7,94	3,44
37	7,39	2,74
39	4,30	1,55
53	13,81	5,54
60	6,96	2,84
64	14,06	5,91
65	4,23	1,50
66	13,87	5,22
68	11,49	4,71
74	8,64	3,58
77	13,56	4,87
78	8,06	3,57
79	12,54	5,02
85	9,91	4,02
86	10,57	3,47
88	17,94	7,51
90	7,08	2,53
91	7,06	2,76

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

Tableau 31 : Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 51 de blé.

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
3	25,47	9,59
9	21,30	7,97
13	19,21	7,02
20	18,28	6,71
21	18,26	6,74
29	16,80	6,20
31	26,36	10,04
32	20,87	7,94
45	22,25	8,33
51	51,55	18,99
56	92,22	35,09
57	26,41	9,70
58	29,33	11,52
59	20,19	7,44
60	21,23	7,83
66	60,92	22,30
71	29,14	11,22
72	27,09	9,83
73	19,95	7,40
74	18,39	6,93
80	21,25	8,36
82	20,52	7,56
92	19,89	7,46
95	22,93	8,45

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

Tableau 32 : Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 74 d'orge.

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
1	4,89	1,67
5	17,32	6,55
7	3,54	1,08
13	2,85	0,94
14	6,65	2,27
18	3,47	1,16
19	7,47	2,70
20	4,76	1,54
26	6,99	2,60
29	12,90	4,68
36	3,42	1,31
39	6,69	2,36
44	2,87	0,85
46	4,40	1,54
51	2,86	0,84
61	4,93	1,68
62	3,22	1,17
63	3,83	1,45
64	3,70	1,29
71	10,23	3,60
77	3,87	1,35
84	4,13	1,47
85	8,60	3,84
95	6,48	2,34

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

Tableau 33 : Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 75 d'orge.

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
1	11,64	4,49
7	3,78	1,52
11	11,81	4,63
17	4,54	2,19
19	5,35	2,12
25	9,73	3,77
27	8,09	3,28
31	2,87	1,28
32	7,93	3,18
33	7,38	2,91
39	5,59	2,44
49	4,47	1,97
50	3,37	1,41
52	3,74	1,69
57	10,68	4,55
60	5,50	2,22
68	4,34	1,82
69	3,07	1,31
73	2,51	1,01
75	3,22	1,70
80	12,06	5,10
83	3,18	1,39
87	5,07	2,36
88	9,64	4,11

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

**Tableau 34: Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 57 d'épeautre.**

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
4	7,16	2,95
7	4,55	2,05
12	6,47	2,68
14	8,00	3,36
19	12,08	5,05
27	8,76	3,85
28	34,22	13,42
29	11,16	4,76
30	11,39	4,68
40	84,64	32,60
41	7,31	3,05
45	5,84	2,85
50	5,42	2,34
53	6,73	2,89
55	8,06	3,31
56	6,11	2,53
59	5,46	2,39
67	5,04	2,42
71	13,85	5,56
78	70,42	26,97
90	8,40	3,52
92	9,07	4,32
93	46,83	18,32
94	6,47	2,80

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

**Tableau 35 : Teneur en matières actives sur les semences de l'échantillon n° 58 d'épeautre.**

N°	Kinto Duo	
	Prochloraz (g/100 kg)	Triticonazole (g/100 kg)
2	98,69	37,56
5	8,63	3,59
6	13,69	5,28
11	87,27	33,73
14	8,40	4,00
16	5,75	2,40
21	11,19	4,82
22	42,06	16,10
26	31,22	11,86
28	15,37	6,03
36	10,58	5,03
37	17,70	7,07
43	5,61	2,49
47	12,56	5,25
49	22,99	8,93
52	27,70	10,75
54	23,46	9,28
65	11,48	4,73
66	57,60	22,17
71	25,74	9,80
76	12,62	4,93
78	10,36	4,15
84	12,30	4,84
87	14,02	5,69

Le tableau reprend les teneurs en prochloraz et triticonazole mesurées par chromatographie liquide à ultra performance. Ces valeurs sont exprimées en g de matières actives par 100 kg de semences. N° = numéro de la semence

### Annexe 3 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives

Tableau 36 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives en fonction des spectres moyens acquis par le Burgermetrics line scan.

Espèce	Traitement	$\lambda$	$N_c$	$N_v$	Moy	SD	Min	Max	RM SEC	RM SECV	RM SEP	RPD <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo Redigo	A	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	5,71	10,10	12,14	0,92	0,42
		B	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	6,21	11,11	8,89	0,84	0,50
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo	A	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	5,78	15,09	15,10	0,82	0,63
		B	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	7,83	15,70	12,22	0,79	0,56
Blé	Kinto Duo	A	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	5,64	13,33	19,26	1,10	0,61
		B	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	7,24	11,35	16,00	1,30	0,55
Orge	Kinto Duo	A	1	1	12,78	NaN	12,78	12,78	2,81	8,81	10,46	NaN	0,34
		B	1	1	12,78	NaN	12,78	12,78	0,72	9,63	9,25	NaN	0,59
Épeautre	Kinto Duo	A	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	9,90	31,32	24,49	0,08	0,21
		B	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	6,29	31,70	21,77	0,08	0,51
Blé, orge, épeautre	Redigo	A	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	2,57	3,46	1,28	0,72	0,41
		B	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	2,24	3,31	2,47	0,76	0,48
Blé	Redigo	A	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	4,74	9,23	1,38	0,30	0,69
		B	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	5,25	9,77	1,90	0,28	0,62
Orge	Redigo	A	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,82	6,98	2,51	0,23	0,77
		B	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,47	7,21	3,01	0,22	0,82
Blé	Kinto Duo Redigo	A	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	0,57	8,87	10,22	1,00	0,76
		B	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	1,05	8,10	10,22	1,10	0,75
Orge	Kinto Duo Redigo	A	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	0,34	6,95	4,99	0,54	0,77
		B	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	0,71	6,16	3,49	0,61	0,87

La colonne espèce reprend les espèces à partir desquelles ont été créées les équations. La colonne traitement reprend les formulations prises en compte pour créer l'équation.  $\lambda$  = longueurs d'onde sur lesquelles sont établis les modèles : dans le cas A, seules les longueurs d'onde comprises entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm ont été considérées. Dans le cas B, toute la gamme de longueurs d'onde a été considérée. L'ensemble des spectres utilisés pour générer ces équations ont été traités avec une SNV et une dérivée (5, 2,1).  $n_c$  = nombre d'échantillons utilisés pour la calibration ;  $n_v$  = nombre d'échantillons utilisés pour la validation ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type des valeurs de référence ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration ; RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée ; RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; CLRMSEP = intervalle de confiance de l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; RPD<sub>cv</sub> = le ratio de déviation de la performance de la validation croisée ; R<sup>2</sup> = le coefficient de détermination des sets de calibrations et de prédiction ; NaN = pas de valeur.

**Tableau 37 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives en fonction des spectres moyens acquis par le Bruker MPA.**

Espèce	Traitement	$\lambda$	$N_c$	$N_v$	Moy	SD	Min	Max	RM SEC	RM SECV	RM SEP	RPD <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo, Redigo	A	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	7,15	8,37	6,76	1,12	0,43
		B	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	7,34	8,85	6,99	1,06	0,40
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo	A	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	8,29	10,58	5,05	1,17	0,63
		B	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	8,37	11,54	5,61	1,08	0,62
Blé	Kinto Duo	A	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	3,32	7,99	0,75	1,84	0,93
		B	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	2,67	9,88	5,61	1,49	0,94
Orge	Kinto Duo	A	1	1	12,78	-	12,78	12,78	1,04	6,70	1,16	-	0,97
		B	1	1	12,78	-	12,78	12,78	0,60	6,62	0,07	-	0,99
Épeautre	Kinto Duo	A	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	4,95	12,94	15,15	0,20	0,85
		B	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	9,00	23,87	3,42	0,11	0,70
Blé, orge, épeautre	Redigo	A	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	2,12	2,43	1,17	1,03	0,59
		B	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	1,92	2,49	0,66	1,01	0,67
Blé	Redigo	A	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	1,98	3,05	1,27	0,90	0,62
		B	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	2,19	3,02	0,97	0,91	0,55
Orge	Redigo	A	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,36	1,82	0,69	0,89	0,78
		B	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,02	1,45	0,85	1,11	0,87
Blé	Kinto Duo, Redigo	A	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	3,55	7,64	6,17	1,17	0,76
		B	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	1,90	9,41	3,87	0,95	0,92
Orge	Kinto Duo, Redigo	A	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	1,31	4,01	3,26	0,94	0,81
		B	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	1,37	4,72	2,95	0,80	0,82

La colonne espèce reprend les espèces à partir desquelles ont été créées les équations. La colonne traitement reprend les formulations présent en compte pour créer l'équation.  $\lambda$  = longueurs d'onde sur lesquelles sont établis les modèles : dans le cas A, seules les longueurs d'onde comprises entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm ont été considérées. Dans le cas B, toute la gamme de longueurs d'onde a été considérée. L'ensemble des spectres utilisés pour générer ces équations ont été traités avec une SNV et une dérivée (5, 2,1).  $n_c$  = nombre d'échantillons utilisés pour la calibration ;  $n_v$  = nombre d'échantillons utilisés pour la validation ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type des valeurs de référence ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration ; RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée ; RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; CLRMSEP = intervalle de confiance de l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; RPD<sub>cv</sub> = le ratio de déviation de la performance de la validation croisée ; R<sup>2</sup> = le coefficient de détermination des sets de calibrations et de prédiction.

**Tableau 38 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives en fonction des 8 spectres acquis par le Burgermetrics line scan.**

Espèce	Traitement	$\lambda$	$N_c$	$N_v$	Moy	SD	Min	Max	RM SEC	RM SECV	RM SEP	RPD <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo, Redigo	A	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	7,72	8,03	10,48	1,16	0,23
		B	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	7,06	7,92	9,40	1,18	0,36
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo	A	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	8,74	9,96	13,48	1,25	0,45
		B	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	9,60	10,20	11,79	1,22	0,41
Blé	Kinto Duo	A	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	8,06	10,45	12,95	1,41	0,49
		B	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	6,79	9,83	9,11	1,50	0,66
Orge	Kinto Duo	A	1	1	12,78	-	12,78	12,78	3,20	4,43	4,70	-	0,66
		B	1	1	12,78	-	12,78	12,78	2,66	3,61	3,10	-	0,78
Épeautre	Kinto Duo	A	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	5,25	9,39	17,92	0,28	0,64
		B	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	7,14	9,94	29,75	0,26	0,21
Blé, orge, épeautre	Redigo	A	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	2,04	2,40	1,73	1,04	0,45
		B	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	1,90	2,23	2,33	1,12	0,62
Blé	Redigo	A	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	2,33	2,60	2,33	1,06	0,44
		B	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	2,47	2,59	2,72	1,06	0,35
Orge	Redigo	A	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,56	2,24	3,81	0,72	0,51
		B	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	1,11	1,74	3,93	0,92	0,63
Blé	Kinto Duo, Redigo	A	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	6,10	7,78	8,91	1,14	0,37
		B	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	6,82	7,71	6,56	1,16	0,31
Orge	Kinto Duo, Redigo	A	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	2,63	3,62	3,69	1,04	0,57
		B	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	2,11	3,03	3,09	1,24	0,72

La colonne espèce reprend les espèces à partir desquelles ont été créées les équations. La colonne traitement reprend les formulations présent en compte pour créer l'équation.  $\lambda$  = longueurs d'onde sur lesquelles sont établis les modèles : dans le cas A, seules les longueurs d'onde comprises entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm ont été considérées. Dans le cas B, toute la gamme de longueurs d'onde a été considérée. L'ensemble des spectres utilisés pour générer ces équations ont été traités avec une SNV et une dérivée (5, 2,1).  $n_c$  = nombre d'échantillons utilisés pour la calibration ;  $n_v$  = nombre d'échantillons utilisés pour la validation ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type des valeurs de référence ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration ; RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée ; RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; CLRMSEP = intervalle de confiance de l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; RPD<sub>cv</sub> = le ratio de déviation de la performance de la validation croisée ; R<sup>2</sup> = le coefficient de détermination des sets de calibrations et de prédiction.

**Tableau 39 : Equation d'étalonnage de la teneur moyenne en matières actives en fonction des 3 spectres acquis par le Bruker MPA.**

Espèce	Traitement	$\lambda$	$N_c$	$N_v$	Moy	SD	Min	Max	RM SEC	RM SECV	RM SEP	RPD <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo, Redigo	A	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	3,87	5,56	6,22	1,68	0,78
		B	33	7	9,67	9,34	2,43	39,38	4,30	6,60	6,60	1,41	0,74
Blé, orge, épeautre	Kinto Duo	A	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	3,13	6,22	10,65	2,00	0,85
		B	8	3	18,29	12,43	3,10	39,38	3,37	6,40	4,86	1,94	0,92
Blé	Kinto Duo	A	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	4,27	5,92	1,25	2,49	0,90
		B	5	1	15,91	14,71	3,10	39,38	4,33	5,88	0,53	2,50	0,89
Orge	Kinto Duo	A	1	1	12,78	-	12,78	12,78	1,15	1,45	1,55	-	0,96
		B	1	1	12,78	-	12,78	12,78	1,02	1,38	0,82	-	0,97
Épeautre	Kinto Duo	A	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	5,12	7,00	15,67	0,37	0,83
		B	2	1	26,99	2,62	25,14	28,84	9,20	11,86	2,81	0,22	0,69
Blé, orge, épeautre	Redigo	A	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	1,32	1,75	1,51	1,43	0,82
		B	17	4	5,36	2,50	2,43	13,74	1,60	1,85	1,36	1,35	0,76
Blé	Redigo	A	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	2,06	2,29	1,13	1,20	0,60
		B	13	3	5,48	2,76	2,43	13,74	1,74	2,15	1,07	1,29	0,71
Orge	Redigo	A	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	0,44	0,81	1,16	1,98	0,96
		B	4	1	4,96	1,61	3,42	6,69	0,57	0,92	1,42	1,75	0,94
Blé	Kinto Duo, Redigo	A	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	2,73	4,55	5,50	1,96	0,84
		B	21	4	8,38	8,91	2,43	39,38	2,71	4,18	4,28	2,13	0,86
Orge	Kinto Duo, Redigo	A	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	0,50	1,25	5,18	3,02	0,71
		B	8	2	6,52	3,77	3,42	12,78	0,87	1,51	3,07	2,50	0,86

La colonne espèce reprend les espèces à partir desquelles ont été créées les équations. La colonne traitement reprend les formulations présent en compte pour créer l'équation.  $\lambda$  = longueurs d'onde sur lesquelles sont établis les modèles : dans le cas A, seules les longueurs d'onde comprises entre 1600 et 1800 nm et entre 2000 et 2400 nm ont été considérées. Dans le cas B, toute la gamme de longueurs d'onde a été considérée. L'ensemble des spectres utilisés pour générer ces équations ont été traités avec une SNV et une dérivée (5, 2,1).  $n_c$  = nombre d'échantillons utilisés pour la calibration ;  $n_v$  = nombre d'échantillons utilisés pour la validation ; Moy = teneur moyenne en matières actives obtenue par la méthode de référence ; SD = écart-type des valeurs de référence ; Min = valeur minimale ; Max = valeur maximale ; RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration ; RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée ; RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; CLRMSEP = intervalle de confiance de l'erreur quadratique moyenne de prédiction ; RPD<sub>cv</sub> = le ratio de déviation de la performance de la validation croisée ; R<sup>2</sup> = le coefficient de détermination des sets de calibrations et de prédiction.

## Annexe 4 : Performance des modèles de discrimination conçus à partir des spectres par pixel acquis avec le Burgermetrics line scan.

Modèle	Classe	Calibration		Validation croisée	
		TP	FP	TP	FP
Blé vs. Orge vs. épeautre	Blé	93,54	3,21	93,56	3,22
	Orge	85,08	4,54	85,00	4,53
	Epeautre	94,51	4,98	94,51	4,99
<b>Blé</b>					
Traité vs. Non traité	Traité	87,58	13,55	87,44	14,01
	Non traité	86,44	12,42	85,99	12,55
Groupe 1 vs. 2 vs. 3	Groupe 1	55,36	20,70	54,44	20,92
	Groupe 2	56,96	30,03	56,3	30,76
	Groupe 3	55,36	19,22	51,94	19,88
<b>Orge</b>					
Traité vs. Non traité	Traité	86,67	8,21	86,22	8,65
	Non traité	91,78	13,33	91,35	12,78
Groupe 1 vs. 2 vs. 3	Groupe 1	78,61	77,34	77,34	27,83
	Groupe 2	58,98	30,17	57,82	30,61
	Groupe 3	58,11	31,30	56,91	31,95
<b>Epeautre</b>					
Traité vs. Non traité	Traité	77,50	22,03	75,14	21,81
	Non traité	77,97	24,50	78,19	24,85

Le tableau résume les matrices de confusion des sets de calibration et de la validation croisée des modèles établis à partir du spectre de chaque pixel. Les données sont exprimées en pourcentage (%). TP (true positive) correspond à la sensibilité, c'est le pourcentage d'échantillons, provenant de la classe étudiée, et que le modèle prédit comme tel. FP est le pourcentage d'échantillons prédit comme venant de la classe étudiée alors que ce n'est pas le cas. Blé vs. orge vs. épeautre correspond au modèle de discrimination des trois espèces de semences. Traité vs. non traité est le modèle de discrimination des échantillons traités ou non traité au sein de chaque espèce. Groupe 1 vs. 2 vs. 3 est le modèle discriminant à laquelle des trois groupes de formulations appartient un échantillon traité.