

RÉSUMÉ

Connaître la composition exacte des matrices végétales notamment en molécules bioactives comme les composés phénoliques, permettrait d'apporter une plus-value aux sous-produits agro-industriels. Vu les variations importantes de contenu en composés phénoliques inter- et intra-variétales et au cours des processus de transformation des fruits, il est essentiel de développer une méthode d'analyse précise et rapide pour pouvoir les identifier et éventuellement les quantifier.

La spectroscopie infrarouge présente de nombreux avantages tels que la rapidité, la facilité d'utilisation et le respect de l'environnement par l'utilisation limitée de solvants. Dans le cadre de ce travail, une méthodologie basée sur la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-MIR), a été développée pour identifier les composés phénoliques présents dans une matrice végétale telle que la pomme. La méthode des extraits secs, c'est à dire la mesure du résidu phénolique après évaporation du solvant, a été appliquée pour toutes nos analyses. Après avoir optimisé les paramètres d'acquisition des spectres et confirmé la répétabilité de la méthode sur l'acide gallique (présenté sous forme d'extrait sec), certains standards de composés phénoliques ont été caractérisés. Pour ce faire, la pelure et la chair de huit variétés de pommes ainsi que trois échantillons de marc ont subi une série de transformations afin d'en obtenir une fine poudre soluble dans un mélange binaire d'éthanol et d'eau. Ensuite, des tests ont été menés sur la matière première (sèche) et l'extrait phénolique de ces huit variétés de pomme. Ces analyses ont permis de mettre au point la méthode de caractérisation spectrale du contenu polyphénolique de pommes à partir d'informations sur les standards phénoliques.

L'analyse des matières sèches et des extraits phénoliques de chairs, pelures et marcs de pommes par un spectromètre FT-MIR, permet d'avoir une première estimation de leur composition en composés phénoliques.

MOTS-CLÉS

Spectroscopie moyen infrarouge, transmission, composés phénoliques, pommes, analyses qualitatives

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les professeurs Pierre-Yves Berken et Mohammed Boukharta, promoteurs de ce travail de fin d'études pour leurs remarques judicieuses et leur aide lors de la rédaction.

Mes remerciements s'adressent également à Pierre Dardenne, chef de département, Marc Lateur, chef d'unité, ainsi que toute l'équipe du Centre wallon de Recherches agronomiques des départements 'Valorisation des productions' et 'Sciences du vivant' pour m'avoir accueillie dans leurs services. Plus particulièrement à Ouissam Abbas et Audrey Pissard, mes maîtres de stage, pour leur aide, leurs idées et le temps qu'elles m'ont consacré, et également à Quentin Arnould et Pascal Dupont, techniciens de laboratoire, pour leur patience et leur contribution tout au long de ce travail.

Finalement, une pensée toute particulière revient à mes proches pour le soutien qu'ils m'ont toujours témoigné.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
PARTIE THEORIQUE.....	2
1. La pomme, source de composés phénoliques.....	2
1.1 Les différentes classes de polyphénols dans la pomme et leur répartition	3
1.1.1 Les acides hydroxycinnamiques	3
1.1.2 Les flavonoïdes	3
2. Analyses classiques des composés phénoliques des pommes	7
3. Analyses alternatives des composés phénoliques des pommes.....	8
4. Spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	9
4.1 Principe de la spectroscopie infrarouge	11
5. Traitement des données spectrales.....	13
5.1 Statistiques sur la répétabilité	13
5.2 Prétraitements des données spectrales	14
5.3 Traitement des spectres par ACP	15
5.4 Interprétation des spectres	15
PARTIE EXPERIMENTALE	17
1. Matériel et méthodes.....	18
1.1 Description des échantillons	18
1.1.1 Pommes	18
1.1.2 Matières sèches	19
1.1.3 Extraits phénoliques	19

1.1.4	Standards polyphénoliques.....	20
1.2	Description du spectromètre HTS / FTIR	20
2.	Caractérisation des pommes.....	23
2.1	Analyse physico-chimique de référence sur pommes	23
2.1.1	Test de maturité (sur une échelle de 1 à 10).....	23
2.1.2	Test de fermeté (kg/cm ²).....	23
2.1.3	Teneur en sucre (BRIX)	24
2.1.4	Dosage de l'acidité titrable (g/l d'acide malique)	24
2.2	Analyse spectroscopique dans le visible.....	24
2.3	Analyse spectroscopique dans le proche infrarouge	25
2.4	Analyse des polyphénols totaux (Folin-Ciocalteu).....	26
3.	Optimisation des paramètres de mesure MIR.....	28
3.1	Nature du solvant.....	28
3.2	Volume d'échantillon déposé sur un puits.....	29
3.3	Concentration de la solution.....	29
3.4	Quantité de dépôt sur un puits.....	30
3.5	Répétabilité de la technique.....	30
3.6	Analyses par spectroscopie mir des matières sèches et des extraits phénoliques	32
4.	Résultats et discussions.....	35
4.1	Caractérisation physico-chimique des pommes	35
4.2	Estimation de la teneur en polyphénols totaux par Folin-Ciocalteu	36
4.3	discrimination des composants et des variétés de pommes.....	38

4.3.1	Discrimination des composants de pommes (chair vs pelure).....	39
4.3.2	Discrimination des variétés de pommes (cidricole vs table)	40
4.4	Caractérisation spectrale des standards phénoliques	41
4.5	Validation du protocole de l'analyse en transmission sur l'HTS.....	43
4.6	Identification du contenu polyphénolique des pommes: Caractérisation spectrale des extraits phénoliques	44
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	47
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
	ABREVIATIONS	54
	LISTE DES FIGURES.....	55
	LISTE DES TABLEAUX.....	56

INTRODUCTION

Les composés phénoliques, communément appelés polyphénols, sont des métabolites secondaires produits par les végétaux notamment sous l'effet du stress, comme par exemple des conditions climatiques particulières ou l'attaque de pathogènes (Faller et Fialho 2010). Ils interviennent dans les propriétés sensorielles des aliments, par exemple dans la couleur (les anthocyanines sont des pigments végétaux associés généralement à la couleur rouge) ou le goût (les tannins influencent l'amertume et l'astringence). Dès lors, ils jouent un rôle important dans le secteur de l'agroalimentaire et peuvent se montrer gênants dans certains processus industriels, puisqu'ils favorisent les réactions de brunissement enzymatique et donc la dégradation de la matrice végétale à laquelle ils sont associés (Cheynier 2006).

De plus, ils se révèlent primordiaux pour le maintien en bonne santé de l'organisme humain : ils ont un effet préventif contre les maladies cardiovasculaires, un effet anti-mutagène et anti-cancérigène, ce sont également des agents anti-microbiens (El Gharras 2009) en partie grâce à leur forte capacité antioxydante. Cependant, leur répartition, quantitative et qualitative, au sein de la plante dépend du stade physiologique ainsi que de l'espèce et de sa génétique. C'est pourquoi ils font l'objet de nombreuses recherches.

Les composés phénoliques sont généralement déterminés par des techniques lourdes et qui nécessitent beaucoup de temps et de solvants. Afin d'en faciliter l'identification et l'évaluation dans les matrices végétales, il semble judicieux de développer une méthode d'analyse plus rapide, fiable, et si possible peu onéreuse (Queji *et al.* 2009).

Présentée comme un candidat approprié pour atteindre cet objectif, la spectroscopie moyen infrarouge a été mise en situation dans cette étude. Ce travail entre dans le cadre du projet plan Marshall financé par la région wallonne « CAPPLE » qui vise au « développement d'un nouvel ingrédient naturel contenant des extraits de pomme contribuant efficacement au contrôle du poids ». Le développement d'une méthode visant à déterminer le profil spectral en composés phénoliques des pommes permettrait de valoriser les sous-produits de l'industrie de la pomme. Pour ce faire, nous nous sommes basés, dans un premier temps, sur l'analyse de standards polyphénoliques connus dans la littérature par leur présence dans les pommes, pour pouvoir, par la suite, analyser des matrices végétales complexes ; la pomme et ses composants individuels. Dans le cadre de ce travail, des analyses de pelure, de chair et de marc de pomme ont été d'application sur un spectromètre FT-IR où les analyses sont réalisées en mode de transmission.

Partie théorique

Cette partie présente la **matière première**, la **spectroscopie infrarouge** et les **outils statistiques** sur lesquelles nous avons basés le développement de la méthode spectroscopique afin de détecter des **composés phénoliques** dans les matrices végétales.

1. LA POMME, SOURCE DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les pommes sont des fruits charnus provenant du pommier. On en distingue généralement deux types : les pommes à cidre et les pommes de tables. Destinées à la fabrication de cidre, les pommes cidricoles sont réparties en cinq variétés : douces, amères, aigres, douces-amères et acidulées. Quelle que soit la variété, celles-ci sont toujours composées d'eau ($\pm 84,3\%$), de glucides ($\pm 12,6\%$), d'acides organiques ($\pm 0,6\%$) dont les composés phénoliques (souvent en quantité plus importante dans les variétés cidricoles)¹, de protides ($\pm 0,3\%$), d'huiles essentielles ($\pm 0,3\%$), d'enzymes (amibiase et oxydase), de pigments, de minéraux et de vitamines).

La structure et les fonctions chimiques de polyphénols sont très variées, mais ils possèdent, au minimum, un noyau benzénique portant un à plusieurs groupements hydroxyles (Colin-H. 2008). Dans les plantes, la majorité des composés phénoliques sont décrits comme les substances dérivées de la voie métabolique de l'acide shikimique² tel l'acide aminé phénylalanine. Mais en réalité, la synthèse des polyphénols suit un processus complexe faisant intervenir cinq voies métaboliques différentes (Annexe I) : (1) la glycolyse qui produit le phosphoénolpyruvate, (2) la voie des pentoses phosphates pour la synthèse de l'erythrose-4-phosphate, (3) la voie de l'acide shikimique qui synthétise la phénylalanine, (4) la voie des phénylpropanoïdes qui intervient dans la production des dérivés de l'acide cinnamique et de la lignine, et finalement (5) plusieurs voies spécifiques aux flavonoïdes. Le métabolisme des composés phénoliques est un système dynamique car leur concentration et leur composition varient au cours des différentes phases de croissance de la plante. Trois types de réactions sont impliqués dans le turnover des composés phénoliques : (1) l'interconversion durant la biosynthèse, (2) les réactions cataboliques et (3) les réactions d'oxydation qui produisent des structures insolubles de haut poids moléculaire (Cheynier *et al.* 2012).

¹ Source : <http://www.sfa-site.com/?q=node/267ENOLS>

² Source : <http://dictionnaire.reverso.net/francais-definition/shikimique>

Les polyphénols des plantes sont répartis en différentes classes en fonction de leur configuration chimique (Annexe II). La diversité de structure de leur squelette connue actuellement est due à plusieurs transformations (hydroxylation, oxydation, réduction, etc.) au sein de ces familles. La pomme, elle, contient deux des grandes classes de composés phénoliques: les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes.

1.1 LES DIFFÉRENTES CLASSES DE POLYPHÉNOLS DANS LA POMME ET LEUR RÉPARTITION

1.1.1 LES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES

Les acides hydroxycinnamiques sont des phénols de type C6-C3 présentant une insaturation en (α , β). Les acides hydroxycinnamiques se trouvent sous forme estérifiée dans le fruit. Les acides para-coumariques, caféiques, féruliques et sinapiques sont les principaux représentants de cette série d'acides hydroxycinnamiques. Dans la pomme (et les fruits en général), c'est l'acide caféoylquinique (encore appelé 'acide chlorogénique') qui est le plus fréquemment rencontré. Les acides 5'-caféoylquinique et 4'-para-coumaroylquinique sont les formes les plus abondantes. Ils peuvent atteindre respectivement jusqu'à 440 et 40 mg/kg de poids frais pour les pommes de table. Ces composés sont les seuls à être les plus abondants dans la chair que dans la peau (l'acide 5'- caféoylquinique amplement majoritaire).

1.1.2 LES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes possèdent un squelette carboné en C6-C3-C6 (noyau flavane). Deux noyaux caractérisent deux cycles aromatiques A et B, et l'hétérocycle central (C) détermine le pyrane. Les différentes sous-classes de flavonoïdes se définissent d'après le degré d'oxydation du pyrane. Les flavonoïdes présents dans la pomme sont répartis dans quatre des sept sous-classes existantes pour les flavonoïdes :

- Les flavan-3-ols
 - Monomères (catéchines)
 - Polymères (proanthocyanidines ou tanins condensés)
- Les dihydrochalcones
- Les flavonols
- Les anthocyanes

1.1.2.1. Les flavan-3-ols

1.2.1.1.1. Monomères (catéchines)

Le squelette des catéchines est le noyau flavane. Quatre stéréo-isomères sont concevables grâce à la présence de deux carbones asymétriques C(2) et C(3) dans cette structure de base. Ces deux isomères sont présents dans la pomme : la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine. La peau contient généralement plus de catéchines que la chair (400 mg/kg dans la peau et 200 mg/kg dans la chair) (Tsao et al. 2003).

1.2.1.1.2. Polymères (proanthocyanidines ou tanins condensés)

Ces composés sont des formes polymérisées de catéchines. Ils sont caractérisés par leurs unités constitutives, leur nombre d'unités et le type de liaison entre ces unités

Lorsque les unités constitutives sont uniquement la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine, ces formes polymériques prennent le nom de procyanidines. Ce sont les seules formes polymériques de flavan-3-ols observées dans la pomme. Elles sont généralement majoritairement constituées de (-)- épicatéchine(EC), la (+)-catéchine (CAT) étant présente en unité terminale.

Le degré de polymérisation (DP) est défini comme le nombre d'unités monomères par molécule. Pour un mélange de procyanidines de DP différents, le degré de polymérisation moyen ou DP_n est utilisé. Dans la pomme il varie généralement entre 2 et 5 mais peut atteindre 50 pour certaines variétés de pommes à cidre.

Les liaisons entre les unités catéchine permettent de distinguer deux types de procyanidines : le type A (liaison C-O-C) et le type B (liaison C-C). Seules les procyanidines de type B sont présentes dans la pomme. La peau est généralement plus riche en procyanidines que la chair (Guyot et al. 1998).

1.1.2.2. Les dihydrochalcones

Ces composés dérivent de la réduction des chalcones et sont des marqueurs spécifiques du fruit. Deux composés principaux sont présents sous forme d'hétéroside dans la pomme : la phloridzine et le xyloglucoside de phlorétine et la phlorétine.

1.1.2.3. Les flavonols

Les flavonols sont caractérisés par l'insaturation de l'anneau C et par la présence d'un groupe hydroxyle en position 3. Ils sont surtout localisés dans les fruits sous formes d'hétérosides, l'aglycone trouvé dans la pomme étant la quercétine. Ils sont à 90 % présents dans l'épiderme, les formes les plus abondantes étant l'hyperoside, la quercitrine et l'avicularine. L'isoquercitrine est présente en faible quantité et la rutine quasiment absente.

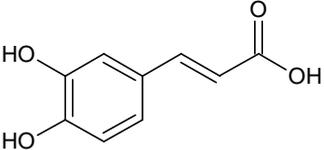
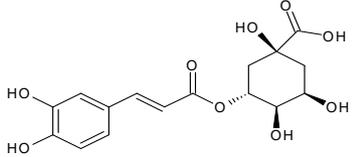
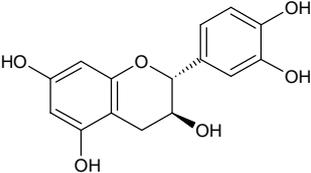
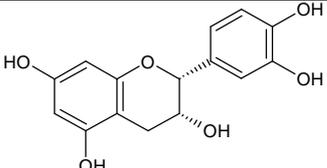
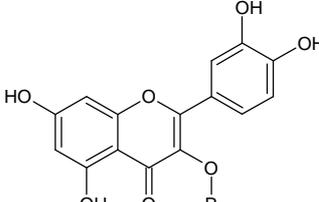
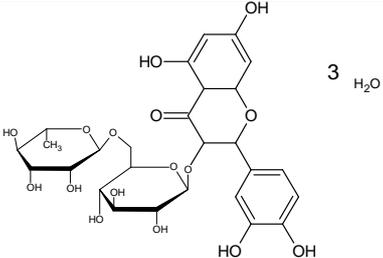
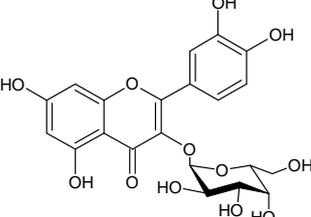
1.1.2.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments et donnent à la plupart des fruits leur couleur rouge, pourpre ou bleue. Ils sont naturellement présents sous forme d'hétérosides. L'anthocyane majoritaire de la pomme est l'idéaine, un hétéroside de cyanidine. Ceux-ci sont plus rarement dosés car ils ne sont présents que dans les pommes de couleur rouge et souvent uniquement dans la peau (Awad *et al.* 2000). L'idéaine y atteint alors jusqu'à 20- 30 mg/kg de peau fraîche.

Le poids et la répartition des composés phénoliques de la pomme ne sont pas équivalents au sein du fruit. En définitive, un kilo de pomme pourrait contenir, selon les études, de 200 mg jusqu'à plus de 3,5 g de polyphénols.

Le Tableau 1 présente les sept composés polyphénoliques dosés par le Celabor et le CRA-W avec leur structure chimique.

Tableau 1 : Structures chimiques des acides phénoliques dosés par le Celabor et le CRA-W

Familles et sous familles des composés phénoliques	Composés phénoliques
Les acides hydroxycinnamiques	<p>Acide caféique</p> 
	<p>Acide chlorogénique</p> 
Les flavonoïdes Flavan-3-ols (Monomères)	<p>Catéchine</p> 
	<p>Epicatéchine</p> 
Les flavonoïdes Flavonols	<p>Quercétine</p> 
	<p>Rutine hydrate</p> 
	<p>Hyperoside</p> 

2. ANALYSES CLASSIQUES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES POMMES

Habituellement, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), les techniques colorimétriques ou l'électrophorèse sont utilisées pour définir la qualité et les propriétés nutritionnelles des aliments. Ces méthodes dites conventionnelles fournissent de bons résultats quelle que soit la matrice végétale étudiée (Ceymann *et al.* 2012, Khanizadeh *et al.* 2008, Jakopic *et al.* 2012). Néanmoins, ces procédés sont longs, onéreux et nécessitent généralement beaucoup de solvants.

Tout comme l'HPLC, **la chromatographie liquide ultra performance (UPLC)** repose sur l'emploi simultané d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Les constituants d'un échantillon sont d'abord séparés les uns des autres suivant leur interaction avec les phases non miscibles, ensuite, ils sont détectés, identifiés et dosés (Smal. 2012). L'UPLC comporte une phase stationnaire composée de particules inférieures à 2 µm qui améliore l'HPLC dans trois domaines : la résolution chromatographique, la vitesse d'analyse et la sensibilité. Cette méthode montre cependant des limites étant donné la durée de vie réduite des colonnes de ce type engendrant plus de maintenance et ainsi plus de coûts.

Le contenu total en composés phénoliques est régulièrement déterminé par la méthode **Folin-Ciocalteu (F-C)**. Néanmoins, cette méthode d'analyse des polyphénols totaux est assez longue à mettre en œuvre. De plus, elle est peu sélective, peu spécifique étant donné qu'elle ne tient pas compte des mécanismes d'oxydation et d'interférence (Siger *et al.* 2012). C'est pourquoi, il arrive par exemple que le résultat obtenu par la méthode F-C soit inférieur à la somme des composés phénoliques identifiés dans une matrice. Cette méthode est peu onéreuse et relativement fiable par rapport à son objectif mais elle ne fait pas de distinction entre les différentes catégories de polyphénols, elle ne se fait que sur un moût/jus, et l'on peut supposer qu'il y a des interférences avec les composés non phénoliques.

3. ANALYSES ALTERNATIVES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES POMMES

Une approche ATR/FTIR, méthode d'analyse devenue populaire, a déjà fait ses preuves en ce qui concerne la facilité et la simplicité de procédure de nettoyage et son potentiel à être une méthode rapide d'analyse des matériaux. Malgré tout, le débit d'échantillonnage limite l'analyse d'un large nombre d'échantillons étant donné que cette méthode ne peut pas traiter plus d'un échantillon à la fois. De ce fait, une microplaque « criblage à haut débit » récemment développée, nous a été proposée pour permettre de surmonter ce problème grâce au mode de mesure en transmission (HTS/FTIR), même si le module HTS permet aussi des mesures en réflexion diffuse.

Les mesures simultanées d'un grand nombre d'échantillons ont déjà pu être appliquées dans quelques études dans le domaine de l'alimentation. L'une d'elles a pu identifier et caractériser cinq genres fongiques isolés lors de la production de boissons à hauts et bas acides (Shapaval *et al.* 2010). D'autres études ont pu mettre l'HTS/FTIR en application pour la détection de l'altération microbienne lors de l'analyse du lait, ainsi que pour la prédiction de sa composition en acides gras (Afseth *et al.* 2010). Récemment, des analyses des bières et de matière grasse de lait ont été réalisées via cet accessoire.

4. SPECTROSCOPIE MOYEN INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER (FTIR)

C'est en 1800 que Frédéric Wilhelm Hershel a découvert le rayonnement infrarouge. Cet astronome anglais s'est basé sur la décomposition spectrale de la lumière au travers un prisme. Il a placé un thermomètre à mercure dans chaque spectre obtenu dans le but d'y mesurer la chaleur propre à chaque couleur. La température est la plus forte du côté rouge du spectre, d'autant plus, au-delà de la zone de la lumière visible. Cette expérience montre que la chaleur se transmet indépendamment d'une lumière visible.

Ces radiations se situent au-delà des longueurs d'onde dans le rouge et sont localisées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Divisé en trois catégories (le proche, le moyen et le lointain IR), le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Nous développerons uniquement le moyen infrarouge dans ce travail.

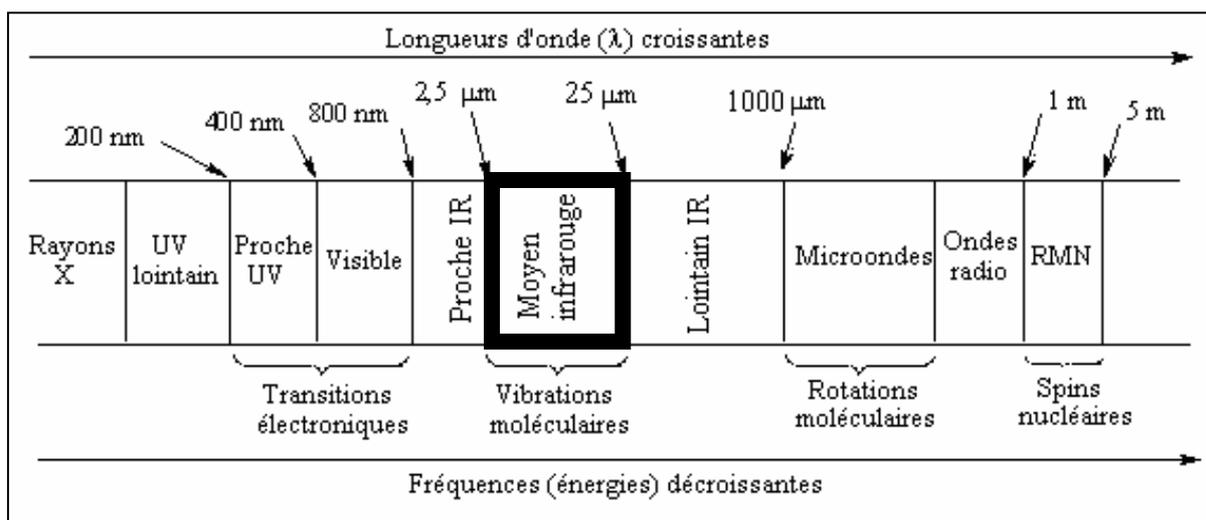


Figure 1 : Spectre électromagnétique.

Le faisceau infrarouge va permettre aux molécules d'un échantillon de passer d'un état dit de repos (S_0) à un état excité (S_i avec $i \geq 1$). Ces molécules vont subir des changements d'état d'énergie appelés 'transitions vibrationnelles' qui, pour le moyen infrarouge, vont absorber partiellement l'énergie du rayonnement.

La loi de Beer-Lambert permet de quantifier l'absorbance : $A_\lambda = \log(I_0/I_t) = \epsilon_\lambda \cdot C \cdot L$

Où A_λ est l'absorbance à une longueur d'onde λ (nm),

I_0 l'intensité initiale de la radiation,

I_t l'intensité transmise,

ϵ_λ le coefficient d'absorption molaire ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),

C est la concentration de l'échantillon (mol.l⁻¹),
 L est l'épaisseur de la cellule comprenant l'échantillon (cm).

La loi de Bohr-Einstein s'applique aux différents niveaux d'énergie : $\Delta E = E_2 - E_1 = h.v$

Où h = constante de Planck et v = fréquence de vibration (cm⁻¹).

Les vibrations des liaisons chimiques ne suivent pas exactement les lois décrites par le modèle harmonique. Elles sont influencées par une **constante d'anharmonicité** qui induit des vibrations à multiples fréquences (fondamentales, harmoniques) telles un ressort qui vibre. On peut observer, sur la courbe de Morse, un positionnement des bandes harmoniques (en bleu) dont la valeur est légèrement inférieure à un multiple entier de la fréquence fondamentale (en vert).

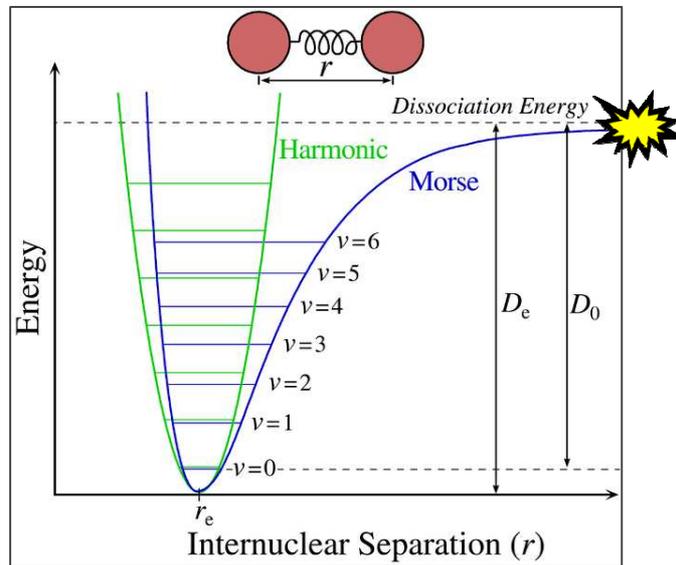


Figure 2 : Énergie potentielle de liaison en fonction de la distance internucléaire

Il est possible de déterminer la fréquence des vibrations fondamentales suivant la loi de

Hooke :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

- Où $\bar{\nu}$ = fréquence de vibration (cm⁻¹)
- μ = masse réduite (g)
- c = vitesse de la lumière = 3.10⁸ ms⁻¹
- m_A, m_B = masse atomique des atomes vibrants (g)
- k = constante de force

La fréquence fondamentale est la plus basse fréquence tandis que les harmoniques ont des fréquences multiples de celle-ci. Le spectre est finalement le signal résultant de l'ensemble de ces fréquences.

4.1 Principe de la spectroscopie infrarouge

Lorsqu'une molécule reçoit un rayonnement proche ou moyen IR, elle entre en vibration. Deux types de mouvement sont possibles : les **élongations** et les **déformations**. Les **élongations** se font le long de l'axe, imaginaire, reliant deux atomes. Elles sont donc définies comme étant la distance croissante ou décroissante entre 2 atomes. Tandis que les **déformations** sont les changements de position des atomes par rapport à l'axe de liaison initial. Une fréquence dite fondamentale et plusieurs fréquences harmoniques correspondent à chaque mode de vibration. Le moyen infrarouge (MIR) comporte uniquement des fréquences fondamentales.

Voici ci-dessous la distinction entre les deux modes de vibration possibles pour en faciliter la visualisation³.

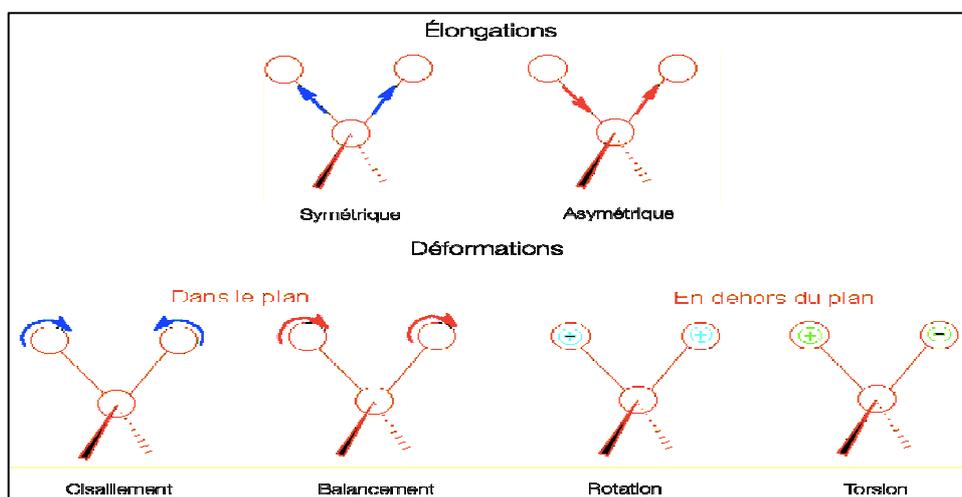


Figure 3: Illustration des vibrations d'une fonction chimique de type méthylène

Il existe deux modes de mesure par spectroscopie MIR : la **transmission** et la **réflexion**. La réflexion, convenant pour l'analyse qualitative et semi-quantitative, va mesurer la quantité d'énergie renvoyée depuis l'échantillon vers le détecteur. La transmission va permettre de comparer l'énergie capable de passer à travers l'échantillon avec l'énergie émise par la source. Il s'agit de la méthode de référence utilisée pour les analyses quantitatives. Contrairement aux analyses en mode de réflexion, l'analyse en mode de transmission, nécessite une plus longue préparation d'échantillons (dissolution dans un solvant).

³ Source : <http://membres.multimania.fr/jjww/page233.htm>

Le schéma (Figure 4) représente le principe de la transmission.

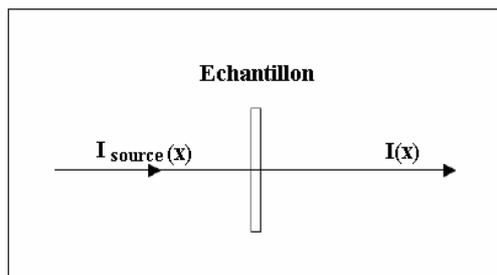


Figure 4 : Principe de la transmission

Le faisceau infrarouge passe à travers l'échantillon. La transmission T est définie comme la fraction d'énergie lumineuse traversant l'échantillon. Avant de percer l'échantillon, l'intensité provenant de la lumière source est égale à I_0 . Une fois ressortie de l'échantillon, elle est égale à I .

On a donc la transmission $T = I/I_0$ et l'absorbance $A = \log(I_0/I)$.

Le pourcentage de transmission (Transmittance) $\% T = 100 \times (I/I_0)$.

À ce stade, il est nécessaire de préciser que le présent TFE s'inscrit dans le prolongement de celui d'une étudiante en agronomie, Géraldine Compère, ayant mis au point une méthodologie basée sur la spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (FT-MIR) où le spectromètre est équipé d'un accessoire à **réflexion totale atténuée** (ATR). Les analyses effectuées par G. Compère ont permis de mettre au point une méthode de caractérisation spectrale des mélanges synthétiques à partir d'informations sur des standards phénoliques.

Sur base de ce travail, nous avons tenté d'optimiser l'analyse **en transmission** sur l'appareil **HTS-XT** (Bruker optics, Ettlingen, Allemagne)⁴. L'objectif, au final, est d'automatiser les analyses spectroscopiques en moyen infrarouge conduisant à la caractérisation du contenu phénolique des matrices végétales telles que la pomme et ses composantes (chair, marc et pelure).

Le moyen infrarouge ciblant la région spectrale entre 4000 et 400 cm^{-1} peut permettre d'identifier les fonctions organiques des polyphénols des pommes.

⁴ Source : <http://www.bruker.com/en/products/molecular-vibrational-spectroscopy/ftir/hts-xt/overview.html>

5. TRAITEMENT DES DONNÉES SPECTRALES

5.1 Statistiques sur la répétabilité

La **répétabilité** consiste en des « mesures successives d'un même objet effectuées dans des mêmes conditions de mesure (même mode opératoire, opérateur, instrument, même lieu, courte période de temps...)»⁵. Autrement dit, il est question de déterminer la variation de la mesure d'un même échantillon, réalisée par un même opérateur, sur le même appareil, sur un court laps de temps, cette variation devant être la plus faible possible. La répétabilité a été évaluée d'une part en se basant sur la moyenne quadratique et d'autre part sur base du coefficient de variation.

La **moyenne quadratique** (RMS-Root Mean Square) compare les absorbances entre les différents spectres d'un même échantillon. Le RMS représente la racine carrée du rapport entre la somme des écarts entre l'absorbance du spectre mesuré et l'absorbance du spectre moyen au carré sur la gamme totale des nombres d'onde (Equation 1).

$$(1) \quad \text{RMS}_j = \sqrt{\frac{\sum_i (\bar{X}_j - X_{ij})^2}{n}}$$

où \bar{X}_j représente l'absorbance du spectre moyen au nombre d'onde i , X_{ij} l'absorbance du spectre j au nombre d'onde i et n représente le nombre de points spectraux enregistrés.

Le **coefficient de variation** évalue la dispersion relative des mesures par rapport à la moyenne. Il se calcule selon l'Equation 2, qui exprime le rapport entre la variance des absorbances entre les répétitions et la moyenne des absorbances à chaque nombre d'onde, multipliée par 100 pour obtenir une réponse exprimée en pourcentage.

$$(2) \quad \text{CV}_i = \frac{\sigma_i}{\bar{X}_i} \times 100 \text{ [%]}$$

où pour un nombre d'onde i , **CV_i** représente le **coefficient de variation**, σ_i la variance et \bar{X}_i la moyenne.

⁵ Govaerts B 2011, Chimimétrie

5.2 Prétraitements des données spectrales

Technique fournissant un très grand nombre de données, la spectrométrie exige des traitements chimiométriques pour extraire rapidement l'information pertinente cachée derrière une matrice spectrale. La chimiométrie « désigne l'ensemble des outils mathématiques, statistiques et autres méthodes basées sur la logique appliqué à la chimie et en particulier à la chimie analytique »⁶ et facilite la compréhension des informations obtenues.

Pour réaliser les analyses de données spectrales, **deux prétraitements mathématiques** ont d'abord été appliqués sur l'ensemble des spectres afin de réduire le bruit et les différences entre les données représentatives d'un même échantillon, l'objectif étant de comparer entre eux plusieurs échantillons de manière **qualitative**.

La **déviatoin normale standardisée** (SNV-Standard Normal Variate) a servi à éliminer les effets de dispersion par centrage en traitant chaque spectre individuellement et donc indépendamment des autres. À chaque nombre d'onde k , la valeur x_k d'une rangée de données X est transformée selon la formule de l'Equation 3.

$$(3) \quad \widehat{x}_k = \frac{x_k - \bar{X}}{\sigma}$$

où \widehat{x}_k représente l'estimateur du spectre après la SNV, \bar{X} représente la moyenne des absorbances du spectre et σ représente la variance des absorbances du spectre.

La **dérivée première** par la méthode de Savitzky-Golay a aussi été appliquée pour éliminer les décalages de la ligne de base. Elle a permis de séparer des bandes qui se chevauchaient et de diminuer efficacement le bruit.

⁶ Govaerts B 2011, *Chimiométrie*

5.3 Traitement des spectres par ACP

Ensuite, **une méthode d'analyse multivariée** appelé **ACP** (Analyse en Composantes Principales) nous a permis de visualiser les informations contenues dans les données en les projetant dans un espace à deux dimensions dont les axes représentent deux nouvelles variables. En effet, des relations entre les variables ont pu être mises en évidence tandis que d'autres ont été discriminées. Pour ce faire, un sous-ensemble de q variables (combinaisons linéaires des variables initiales) est créé. Les meilleures représentations graphiques des ACP selon chacune des nouvelles variables ont finalement été retenues dans ce travail.

L'application de l'ACP, dans notre cas, était essentielle afin de différencier les composants de la pomme (chair et pelure sur base de leurs spectres) et de discriminer les variétés des pommes. La différenciation se base sur un **regroupement des échantillons** correspondant à une même famille et l'**écartement de ce groupe** du reste des échantillons.

5.4 Interprétation des spectres

Chaque vibration pour une liaison donne lieu à un nombre d'onde caractéristique. Le spectre du rayonnement infrarouge est divisé en deux catégories. La première définit les **vibrations d'élongation** tandis que l'autre caractérise essentiellement les **vibrations de déformation** en plus de quelques vibrations d'élongation de groupements fonctionnels (aussi appelée « **Fingerprint** »). La localisation des bandes d'absorption de fonctions chimiques dans la région du MIR est synthétisée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Table des combinaisons entre les régions du spectre moyen infrarouge et des liaisons chimiques

Frequency, cm ⁻¹		Group Vibration	Intensity [#]	Description	Mainly observed in
4000	3000				
		O-H stretch	vs	Hydroxyl	Liquid phase
		=C-H stretch	s-m	Unsaturated	Lipids
		-C-H stretch	s-m	Saturated	Lipids
		-C≡N stretch	m	Nitrile	
		C=O stretch	s	Ester	Lipids, Amino Acid
		C=O stretch	s	Carboxylic acid	Lipids, Amino Acid
		C=O stretch	s	Amide I	Proteins
		C=C stretch	m-w	Not conjugated	Lipids
		C=C stretch	m	<i>Trans</i>	Lipids
		C=C stretch	m	<i>Cis</i>	Lipids
		N-H bending	s	Amide II	Proteins
		C-H scissoring	m	Aliphatic -CH ₂	Lipids
		C-O stretch	s	Carboxylates	Amino Acids, Lipids
		N-H bending	w-m	Amide III	Proteins
		P=O stretch	vs	Phosphate ester	Lipids, Nucleic Acids
Fingerprint from skeleton					
		C-O stretch	s	Ether	Carbohydrates
		Skeletal mode		α -(1→4) linkage	Starch
		C-O-C skeletal	m-w	β -configuration	Glucose, galactose, mannose
		C-O-C skeletal	m-w	α -configuration	
		C-H rocking	w-m	Aliphatic -CH ₂	Lipids
		Skeletal mode			Starch

L'essentiel de l'information relative aux composés phénoliques est contenu dans la région de 1800 à 700 cm^{-1} . En effet, les spectres supérieurs à 1800 cm^{-1} présentent des bandes larges dues à la présence des fonctions hydroxyles des composés phénoliques. Tandis que les spectres inférieurs à 700 cm^{-1} contiennent peu d'informations exploitables (Figure 5). De plus, la région spectrale incluse entre 2000 et 2500 cm^{-1} peut contenir des bandes spectrales du CO_2 existant dans l'atmosphère. Par conséquent, la région de 1800 à 700 cm^{-1} (appelée « fingerprint ») a été extraite pour l'analyse et la caractérisation des composés phénoliques.

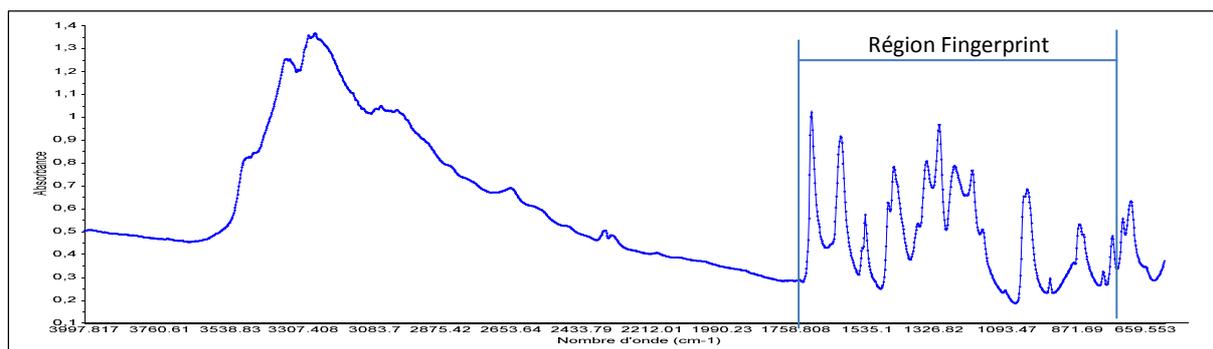


Figure 5 : Spectre MIR d'un standard d'acide gallique sous forme d'extrait sec

Partie expérimentale

Afin d'identifier les composés phénoliques, nous avons tenté de développer et d'optimiser une méthode basée sur la spectroscopie FT-MIR en mode de transmission.

Dans un premier temps, les pommes ont été soumises à des analyses de référence et des analyses spectroscopiques dans le visible ainsi que dans le proche infrarouge. Ensuite, les matières sèches ont été générées en lyophilisant la pelure et la chair des pommes préalablement épluchées. Une fois broyées, les matières sèches (MS) sont transformées en poudre pour permettre la mesure des polyphénols (PPH) totaux. Finalement, elles sont extraites à l'aide d'une solution 'éthanol-eau' (50% - 50%) avant d'être filtrées, lyophilisées puis broyées à nouveau afin d'obtenir les extraits phénoliques (EP). Ceux-ci ont été analysés par le CELABOR⁷ (partenaire du projet Capple) en UPLC et par nous (CRA-W) en spectroscopie MIR. Les données obtenues seront utilisées comme les valeurs de référence pour pouvoir créer des combinaisons de polyphénols par la suite. Toutes les données récoltées, seront ajoutées à celles déjà obtenues lors de la première phase du projet CAPPLE⁸.

Dans un second temps, nous avons optimisé la méthode d'acquisition spectrale, en mode de transmission, des composés phénoliques en réalisant l'exercice sur l'acide gallique (considéré comme un standard de référence dans tous types d'analyses des polyphénols et les matrices riches en ces composés). Ensuite, des mesures en transmission ont été appliquées sur les matières sèches ainsi que sur les extraits phénoliques selon la méthode des extraits secs (dépôt d'un composé sous sa forme liquide, attente de l'évaporation du solvant et formation d'un précipité solide). Des standards polyphénoliques (STD PPH) présents dans les pommes, les extraits phénoliques les matières sèches, ont eux aussi été analysés par spectrométrie FT-MIR. Cela nous a permis de mettre au point une méthode automatisée d'analyse en mode de transmission.

⁷ Le CELABOR est un centre de services scientifiques et techniques installé à proximité de Verviers (<http://www.celabor.be/>).

⁸ Le projet CAPPLE vise au « développement d'un nouvel ingrédient naturel contenant des extraits de pomme contribuant efficacement au contrôle du poids ». Cf. Rapport de stage (<http://www.wagralim.be/capple.php>).

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La préparation et l'analyse de l'ensemble des échantillons objets de ce travail, ont été réalisées selon la démarche présentée Figure 6 :

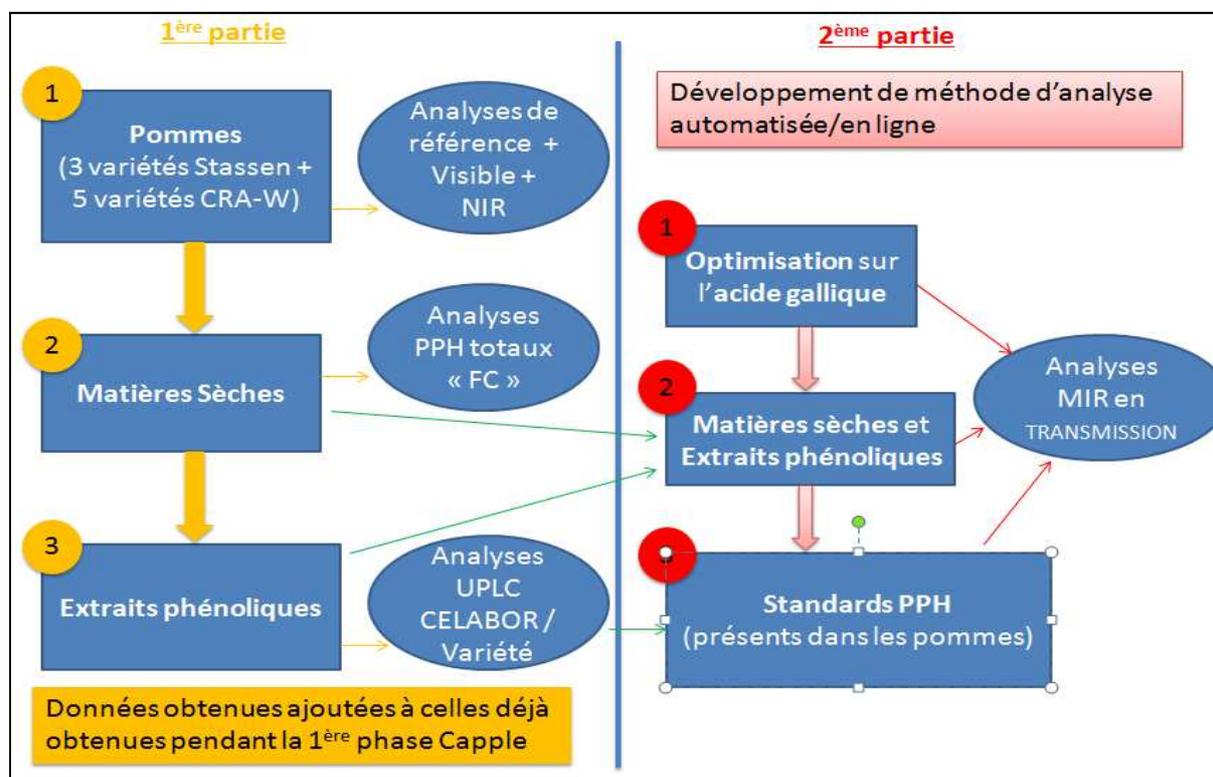


Figure 6 : Succession des échantillons et des analyses réalisées sur chacun d'eux

1.1 DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS

1.1.1 POMMES

Au total, huit variétés de pomme ont été analysées dans ce travail.

- Trois variétés cidricoles : Marie Menard (MM), Frequin Rouge (FR), Jeanne Renard (JR) ; proviennent de la cidrerie **Stassen**.
- Cinq variétés de table : *La Bazadaise* (M 23), Président Van Dievoet (PVDV), Reinette de France (Rtte Fr), JM1^{*9}, AF 40^{*}; proviennent de la collection du **CRA-W**.

^{*9} Cultivars provenant du programme d'amélioration mené au CRA-W et en collaboration avec le CRRG — Centre régional des ressources génétiques du Nord Pas-de-Calais — en vue de la création de nouvelles variétés commerciales de pommes destinées à renouveler et à diversifier le marché.

L'échantillonnage doit être le plus représentatif possible de la variété. Idéalement, il aurait fallu une dizaine de fruits, mais six fruits entiers ont été repris pour chaque variété.

1.1.2 MATIÈRES SÈCHES

À partir des pommes des huit variétés de départ, la pelure et la chair ont été séparées avec une peleuse mécanique puis ont été lyophilisées pour pouvoir être broyées. Cinq échantillons de marc prélevés en cours de la transformation des pommes à cidre, ont eux aussi été lyophilisés et broyés.

Environ 1 g de poudre des 21 échantillons de matières sèches a été prélevé dans des flacons préalablement tarés. Après avoir ajouté 6,0 ml de méthanol, les flacons (comprenant les extraits de matière sèche dits « méthanoliques ») ont été placés au réfrigérateur jusqu'à la préparation de l'analyse des polyphénols totaux. En effet, un solvant tel que le méthanol a été nécessaire pour inactiver les polyphénols-oxydases, des enzymes intervenant dans l'oxydation des polyphénols et conduisant au phénomène de brunissement.

Le reste de poudre des matières sèches a été conservé à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur en vue des analyses MIR.

1.1.3 EXTRAITS PHÉNOLIQUES

À partir des échantillons des matières sèches (de chair, de pelure et de marc de pomme), la poudre a été mise en suspension dans une solution d'éthanol et d'eau (50%-50%) pendant trois heures à température ambiante en respectant le rapport solide/liquide '1/7'. La combinaison de l'éthanol avec l'eau permet d'améliorer l'extraction des composés phénoliques glycosylés. Tandis que le rapport solide/liquide suit le principe du transfert de la matière en fonction du gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide (Telli *et al.* 2010).

Après avoir subi l'extraction hydro-alcoolique, la purée de pomme a été filtrée, lyophilisée et broyée. Environ 10 g d'extraits phénoliques de chair, de pelure et de marc ont été obtenus. La moitié des poudres a été envoyée au Celabor pour les analyses UPLC, tandis que l'autre moitié a été réservée pour les analyses MIR.

1.1.4 STANDARDS POLYPHÉNOLIQUES

Le CRA-W dispose de quarante standards de composés phénoliques présents sous forme de poudre. Douze standards (Tableau 3) de composés phénoliques spécifiques à la pomme ont été sélectionnés pour en solubiliser environ 10 mg dans 20 ml de solvant éthanol-eau à 50% et ainsi être analysés. Les six derniers standards sont communs avec ceux qui ont été analysés par le Celabor.

Tableau 3 : Liste des standards analysés en transmission au microscope

Analyses HTS	1	2,5- dihydroxybenzoic
	2	2 hydroxycinnamic
	3	4 hydroxybenzoic
	4	Acide ellagique
	5	tanins
	6	Acide vanillique
Analyses HTS + UPLC	7	Acide caféique
	8	Catechine
	9	Acide chlorogénique
	10	Quercétine anhydrous
	11	Rutine
	12	Hyperoside

La méthode d'analyse réalisée par le Celabor doit rester confidentielle. Néanmoins, le principe général de cette analyse classique a déjà été énoncé dans la partie théorique (Chapitre 2). Le CELABOR assure, entre autres, un support scientifique et technique aux entreprises dans les domaines de l'agro-alimentaire (nutrition et extraction). Ils nous ont permis d'obtenir des résultats fiables sur la composition spécifique en polyphénols des extraits phénoliques par analyses UPLC. Nous avons pu alors comparer nos données aux leurs et ainsi évaluer le potentiel de la spectroscopie MIR afin d'estimer le contenu phénolique des échantillons de pommes étudiés.

1.2 DESCRIPTION DU SPECTROMÈTRE HTS / FTIR

Nous avons rencontré des problèmes techniques lors de l'acquisition du module HTS-XT, alors nous avons choisi d'optimiser la méthode des analyses en transmission en utilisant un microscope moyen infrarouge dont nous disposons (le microscope Hypérior 3000). L'appareil fut utilisé comme un spectromètre classique (la fonction de microscopie n'a pas été utilisée). La méthode a ensuite été transposée à l'appareil de routine : l'HTS-XT. Le fonctionnement du spectromètre est schématisé et explicité en Annexe III. Le spectromètre FTIR (Figure 7) qui a été utilisé dans le cadre du TFE comprend cinq parties :

- 1) une **source** lumineuse MIR,
- 2) un **interféromètre** (dispositif mesurant toutes les fréquences simultanément par production d'interférences),
- 3) un compartiment pour l'**échantillon** [le tiroir motorisé sert à l'insertion de la plaque en silicium à micro-titration standards de 96 puits (support transparent en MIR) (Figure 8)],
- 4) un **détecteur DLaTGS** (Deuterated L-alanine-doped TriGlycine Sulphate) dont la gamme spectrale s'étale de 12000 à 160 cm^{-1} ,
- 5) un **ordinateur** (convertisseur de signal analogique en un signal numérique) qui constitue le système d'acquisition des données.

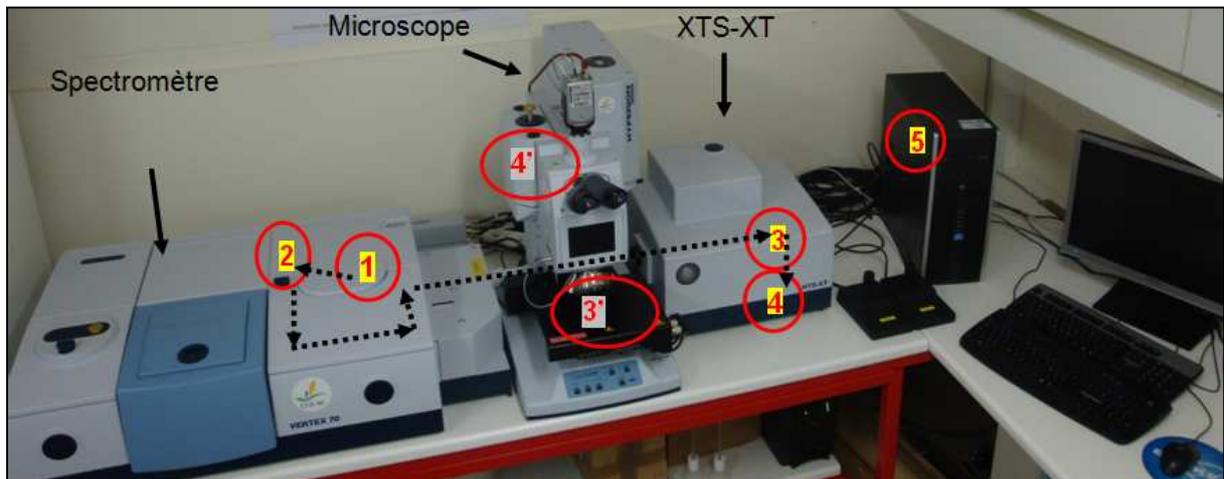


Figure 7 : Spectromètre VERTEX 70 (à l'extrême gauche) couplé avec le microscope HYPERION 3000 et le module à extension HTS-XT (au centre), suivi de l'ordinateur (à l'extrême droite). Les flèches en traits pointillés représentent le parcours du rayonnement infrarouge (réfléchi sur plusieurs miroirs optiques) depuis la source (1) jusqu'au détecteur (4) de l'HTS-XT.



Figure 8 : Micro plaque insérée dans le tiroir motorisé

En l'attente d'une utilisation fonctionnelle de l'HTS-XT et afin de rentabiliser au mieux le temps qui nous a été imparti, l'appareil de routine employé pour optimiser l'analyse par l'HTS-XT est le **microscope Hypérior 3000** (capable de travailler en transmission). Le spectromètre est détaillé Figure 9, tandis que la plateforme à échantillon (3') et le détecteur

MCT ZnSe [Mercure-Cadmium-Tellure Sélénure de Zinc refroidit à l'azote liquide allant de 12000 à 600 cm^{-1} (4')] du microscope sont positionnés sur les Figures 10 et 11.

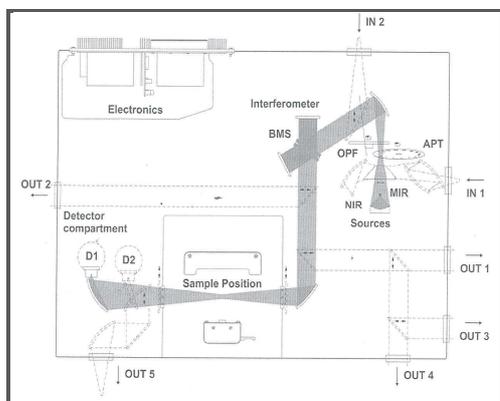


Figure 9 : Schéma d'une vue aérienne du spectromètre VERTEX 70

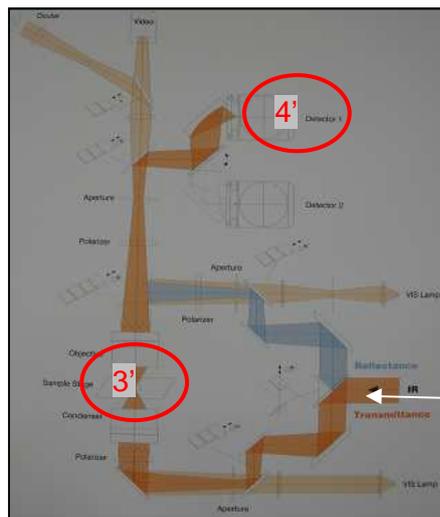


Figure 10 : Schéma d'une coupe transversale du microscope HYPERION 3000

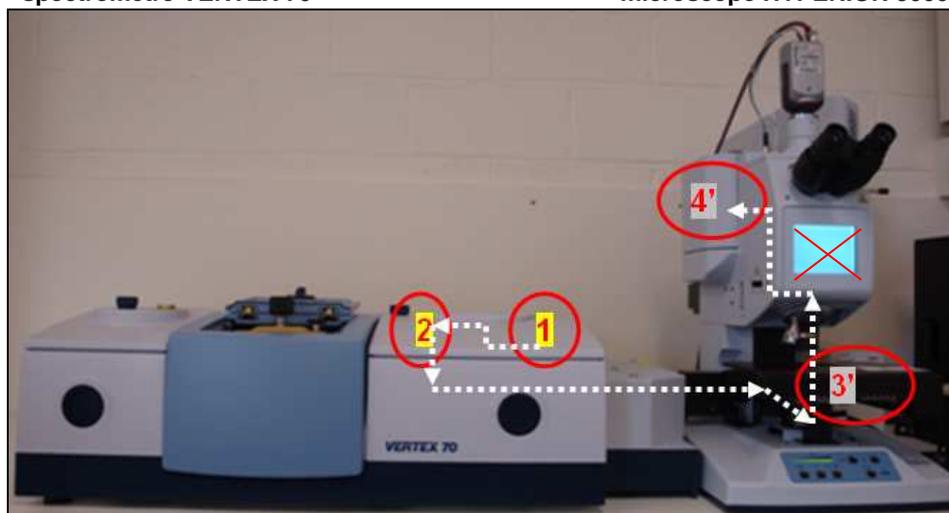


Figure 11 : Photo du spectromètre VERTEX 70 (à gauche) couplé avec le microscope HYPERION 3000 (à droite)

Le porte échantillon consiste en une microplaque en silicium gravée de 96 puits d'un côté. Ces puits sont des anneaux hydrophobes vernis de 7 mm de diamètre qui permettent aux échantillons aqueux d'être contenu à l'intérieur de chaque puits. L'autre côté de la plaque a la surface d'un miroir poli. Ces deux faces ont impérativement été nettoyées et séchées avant d'y déposer l'échantillon dans les puits.

L'acquisition des données spectrales des échantillons a été effectuée via le logiciel « OPUS/LAB ® 7.2 » (Bruker Optics GmbH), tandis que le traitement et l'évaluation des données spectrales se sont fait via le logiciel « The Unscrambler ® X ». Cependant, les calculs de répétabilité ont été réalisés sur « Microsoft Excel 2010 ».

2. CARACTÉRISATION DES POMMES

2.1 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE SUR POMMES

Les quatre analyses suivantes, nous ont renseignées sur les caractéristiques physico-chimiques des fruits de chaque variété de pomme.

2.1.1 TEST DE MATURITÉ (SUR UNE ÉCHELLE DE 1 À 10)

L'amidon présent dans les pommes se transforme par hydrolyse en sucres simples au cours de la maturation des fruits. Un test de colorimétrie est simple à mettre en œuvre pour nous renseigner sur le niveau de maturité. Une solution d'iode est utilisée pour colorer l'amidon en violet. La progression et l'intensité de la coloration vont tous deux varier en fonction de la disparition de l'amidon. Il est alors possible de déterminer le stade d'évolution de la maturité des fruits en se basant sur une échelle de 1 à 10.

On utilise une solution constituée de 1% d'iode (I_2) et de 4% d'iodure de potassium KI. Cette solution doit être fréquemment renouvelée (tous les 3 mois).

Après avoir coupé le fruit "à son équateur" de manière à obtenir une tranche de 5 mm d'épaisseur environ, on asperge l'une des faces avec la solution d'iode. L'observation des résultats se fait environ après une minute. Une comparaison peut ensuite être établie entre nos résultats et ceux des tests de référence afin de les classer dans les catégories adéquates.

2.1.2 TEST DE FERMETÉ (KG/CM²)

Un pénétromètre de type « FT327 » est utilisé afin d'évaluer la fermeté des fruits. La lecture de l'index se fait en kg/cm².

Sur chaque fruit, deux mesures sont réalisées sur les faces préalablement identifiées (A et B). On aura retiré auparavant un disque de pelure d'un diamètre de 12 à 15 mm avec une lame adaptée.

Après avoir placé le fruit au point choisi (c.-à-d. la partie de la pomme sans pelure) sous l'embout, il faut enclencher le bouton de 'retour-aiguille', saisir l'instrument et appuyer progressivement jusqu'à ce que l'embout pénètre dans la chair du fruit jusqu'au cran. Il faut finalement lire la valeur sur l'écran qui représente la dureté du fruit.

2.1.3 TENEUR EN SUCRE (°BRIX)

Un réfractomètre numérique à main (PAL-1 Atago) est utilisé pour mesurer la teneur en sucre de la pomme exprimée en Degré Brix (1°Bx = 1 g sucre /100 g de solution).

À l'aide d'une presse, on compresse les fruits et on obtient du jus de pomme. Ensuite, 2 à 3 gouttes de jus sont réparties sur la surface du prisme. Après avoir appuyé sur 'START', il faut attendre environs 3 secondes. La valeur digitale affichée indique le degré Brix.¹⁰

2.1.4 DOSAGE DE L'ACIDITÉ TITRABLE (G/L D'ACIDE MALIQUE)

Un appareil à titrage (Titroline) est utilisé pour doser l'acidité titrable. Il a permis de déterminer la quantité d'acide malique dans la pomme.

Environs 5 ml de jus de pomme sont ajoutés à 10 ml d'eau déminéralisée. Le titrateur va injecter automatiquement un certain volume d'NaOH à la solution préparée. Lorsque la sonde à pH mesure une acidité à 8,2, la valeur de NaOH est stabilisée sur l'écran et est retenue, puis corrigée avec un coefficient (0,67) afin d'ajuster la valeur d'acidité pour obtenir la concentration d'acide malique.

2.2 ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DANS LE VISIBLE

Le DA meter (M. C. Miller Co., U.S.A.) mesure la régression de la chlorophylle du fruit en faisant la différence des absorbances à 2 longueurs d'onde données : 720 et 670 nm. Il permet de suivre la maturation du fruit et de déterminer la date exacte de la récolte directement sur le fruit par un indice compris entre 0 et 2

Il a été rendu possible de classer les échantillons en fonction de la moyenne ou de la distribution de l'indice DA. Par exemple, pour les variétés Gala, Red Delicious et Braeburn, si la mesure du DA meter est inférieure à 0,3, cela signifie que sa consommation peut être immédiate. Tandis que si la valeur est supérieure à 0,5, le fruit sera gardé en conservation. Cet appareil mobile est non destructeur, facile à utiliser et non tributaire des conditions climatiques. Par contre, il est nécessaire de gérer les échantillons en fonction de la moyenne ou de la distribution de l'indice DA. Il faudrait donc définir des marges pour la consommation et la conservation pour chaque variété, ce qui n'a pas encore été établi par la littérature. Par conséquent, il reste difficile de valoriser les valeurs obtenues à l'heure actuelle.

¹⁰ Source Figure 1 : http://www.atago.net/French/products_pal.php

2.3 ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DANS LE PROCHE INFRAROUGE

L'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme outil de sélection rapide de variétés de pommes de qualité nutritionnelle et diététique différenciée présente de nombreux avantages. En effet, cet outil multiparamétrique est non-destructif et peut s'utiliser en ligne. Cette analyse NIR (Near Infrared = proche infrarouge) permettra l'établissement d'un screening spectroscopique. Cette méthode d'analyse qualitative facilite la discrimination de certaines données et le regroupement des autres, son domaine s'étendant de 12500 à 4000 cm^{-1} (entre 800 et 2500 nm).

Deux sortes de spectromètre NIR ont été utilisées. Le premier (Figure 12) est fixe tandis que le second (Figure 13) est portable.



**Figure 12 XDS (FOSS NIRSystems, Inc.)
400 – 2500 nm (VIS et NIR)**



**Figure 13 : PHAZIR (Polychromix,
Inc.) 1000 – 1800 nm (NIR uniquement)**

Sur le XDS, les deux faces (A et B) de la pomme sont posées sur un support afin d'y être mesurées. Pour améliorer la précision de la valeur, on effectue ces mesures dans les deux sens sur chaque face. La résolution est de 16 cm^{-1} et on applique 32 scans pour une même mesure. Sur le Phazir, les deux faces (A et B) de la pomme sont placées contre l'appareil avec un contact étroit empêchant la luminosité de la pièce d'interférer avec le rayonnement infrarouge. La résolution n'est pas déterminée et on applique 5 scans pour une même mesure.

Les résultats issus de ces deux analyses, permettent d'accroître les bases de données du CRA-W et serviront au projet CAPPLE pour développer des modèles de calibration pour déterminer de façon non destructives les paramètres de qualité (dont les polyphénols) des pommes. Nous avons choisi de ne pas les interpréter dans le présent travail, faute de temps.

2.4 ANALYSE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX (FOLIN-CIOCALTEU)

Les polyphénols totaux sont dosés à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (réactif phosphomolybdotungstique) en présence d'une solution saturée de carbonate de sodium. Les teneurs sont exprimées en équivalents « acide gallique » utilisés comme référence.

Pour réaliser la droite d'étalonnage, une première **solution stock de référence** (SSRef.) à 10 mg d'acide gallique a d'abord été préparée dans 100 ml d'« eau mq » (eau Milli Q = eau filtrée ultra pure). Ensuite, a eu lieu la préparation d'une deuxième **solution à 35% en poids de carbonate de sodium**. Dans un berlin de 500 ml préalablement taré, environ 70 g de carbonate de sodium ont été pesés et de l'eau déminéralisée y a été ajoutée jusqu'à 200 ml. Après avoir déposé un aimant dans ce même berlin, ce dernier a été placé sur une table d'agitation pour que la solution s'homogénéise et ne cristallise pas. Les volumes des différentes solutions à ajouter dans 11 fioles sont précisés Tableau 4.

Tableau 4 : Tableau reprenant tous les volumes des différentes solutions ajoutées.

	Volume de SSRef (µl)	Vol eau mq (ml)	Vol réactif Folin (ml)	Volume Solution carbonate de sodium (ml) à ajouter 3 minutes après le réactif de Folin	Volume eau mq à rajouter pour porter à 10 ml
1	0,0	5,2	0,5	1,0	3,3
2	0,2	5,0	0,5	1,0	3,3
3	0,4	4,8	0,5	1,0	3,3
4	0,6	4,6	0,5	1,0	3,3
5	0,8	4,4	0,5	1,0	3,3
6	1,0	4,2	0,5	1,0	3,3
7	1,2	4,0	0,5	1,0	3,3
8	1,4	3,8	0,5	1,0	3,3
9	1,6	3,6	0,5	1,0	3,3
10	1,8	3,4	0,5	1,0	3,3
11	2,0	3,2	0,5	1,0	3,3

Ensuite, 40 µl d'extrait méthanolique de chaque variété de pomme, ont été prélevés et mis dans une fiole. Nous avons ajouté 5,0 ml d'eau mq, 0,5 ml de réactifs de Folin, 1,0 ml de carbonate de sodium à 35 % puis 3,460 ml d'eau mq.

Après une heure, la densité optique par spectrophotométrie après a été mesurée à une longueur d'onde de 725 nm.

L'équation [$y = ax + b$] de la droite d'étalonnage établie, nous a permis de calculer la concentration des polyphénols totaux au sein des deux composants (chair et pelure) de

chaque variété de pomme. Ainsi, après avoir soustrait « b » à la valeur de l'**absorbance** « y » et après avoir divisé le tout par « a », nous avons obtenu la **concentration** « x » (en mg/ml). Cette dernière a finalement été multipliée par « 150 » pour obtenir la valeur de la concentration des polyphénols totaux (en µg/g) calculée suivant l'Equation 5.

$$(5) \quad C = 15^* \times T \times 10 \% \text{ de matière sèche}$$

où C est la concentration en polyphénols totaux exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (µg EAG/g d'extrait) et T représente la teneur en acide gallique mesurée par la droite d'étalonnage.

* car on a dilué 15 fois l'échantillon méthanolique (6,0 ml de méthanol ajouté à 1,0 g de matière sèche).

3. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE MESURE MIR

Avant de mesurer les spectres MIR des échantillons de matières sèches, d'extraits phénoliques et, des standards phénoliques, les paramètres susceptibles d'influencer la qualité des spectres (tels que la nature du solvant, le volume d'échantillon déposé sur un puits, la concentration de la solution, ainsi que la quantité de dépôt sur un puits) ont été optimisés sur des solutions d'acide gallique. Cet acide a été choisi pour optimiser la méthode d'analyse en transmission étant donné que c'est le polyphénol le plus abordable et le plus abondant détenu par le CRA-W en plus d'être largement étudié dans la littérature. En effet, les teneurs du dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux réalisé à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, sont exprimées en équivalents « acide gallique ».

3.1 NATURE DU SOLVANT

Un mélange binaire d'éthanol et d'eau a été choisi comme solvant. Trois combinaisons ont ainsi été testées. Les résultats de l'optimisation de la composition du solvant sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 5 : Optimisation de la nature du solvant

Nature du solvant	Pourcentage d'Ethanol 96%	25%	50 %	75%
	Pourcentage d'Eau	75%	50%	25%
Observation des gouttes	- Moins bonne dissolution de l'extrait et temps de séchage plus long	+ La goutte ne s'étale pas et le temps de séchage est raisonnable (20 minutes sous la hotte à flux ou 1h30 à l'air ambiant)	- Etalement de la goutte hors du puits qui rend impossible l'analyse MIR, tant d'un point de vue pratique que de précision	
Observation des spectres	- Une partie de la fingerprint est moins résolue car l'eau influence le spectre	+ Bons résultats obtenus	- L'analyse a été rendue impossible suite à l'étalement de la goutte	

3.2 VOLUME D'ÉCHANTILLON DÉPOSÉ SUR UN PUIITS

Une succession de gouttes de 15, 20, 25 et 30 μl ont été déposées sur chaque puits pour en observer le recouvrement. Au final, 25 μl ont été retenus pour la suite des analyses MIR étant donné que ce volume remplit au maximum un puits sans déborder. Il est primordial que la goutte s'étale et sèche de manière uniforme sur toute la surface. Nous pouvons observer sur les deux figures ci-dessous le résultat de cristallisation des polyphénols. Il est donc important de bien observer les dépôts après évaporation du solvant afin de s'assurer de la couverture idéale du puits.



Figure 14 : Photo d'un extrait sec de quercétine correctement réparti sur la surface du puits

Figure 15 : Photo d'un extrait sec d'acide caféique qui a cristallisé sur la surface du puits

3.3 CONCENTRATION DE LA SOLUTION

Pour obtenir des solutions d'acide gallique à différentes concentrations, une solution mère de 1000 ppm a été fabriquée à partir de 50 mg d'acide gallique et de 50 ml d'éthanol à 96% dans un ballon jaugé. Les solutions sont réalisées après plusieurs dilutions : un volume déterminé de la solution de 1000 ppm (Tableau 6) est prélevé et déposé dans un ballon jaugé de 25 ml. Le volume est porté au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée et la solution est ensuite homogénéisée par simples inversions. Quatre solutions d'acide gallique allant de 200 à 500 ppm ont été conçues pour l'identification de ses fréquences vibrationnelles caractéristiques.

Tableau 6 : Volumes nécessaires pour l'optimisation de la concentration de la solution

Concentrations	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm
Volume prélevé	5 ml	7,5 ml	10 ml	12,5 ml
Volume d'eau ajouté	20 ml	17,5 ml	15 ml	12,5 ml
Observation des spectres	-	-	-	+

Les concentrations supérieures à 500 ppm n'ont pas été prises en compte car nous souhaitons travailler avec une concentration aussi faible que possible (les concentrations réelles des polyphénols dans les matrices végétales sont assez faibles).

3.4 QUANTITÉ DE DÉPÔT SUR UN PUIITS

Finalement, plusieurs mesures prises sur des gouttes cumulées ont permis d'optimiser l'épaisseur du dépôt. Sachant que le volume optimal d'une goutte est de 25 µl, alors nous pouvons déterminer la quantité idéale de dépôt après le cumul d'un certain nombre de gouttes (allant de 2 à 6).

Tableau 7 : Accumulation optimale de goutte par puits

Nombre de goutte par puits	1	2	3	4	5	6
Volume de solution par puits	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl
Observation des spectres	- -	-	+	++	++	++

Aucune différence significative n'est ressortie pour les spectres obtenus de 3 à 6 gouttes. L'addition de 3 gouttes a été retenue pour la suite des analyses afin de raisonner au mieux le temps de préparation des microplaques. Sachant qu'1h30 a été nécessaire pour qu'une goutte de 25 µl sèche à température ambiante, l'ajout de trois gouttes signifie qu'il a fallu 4h30 pour qu'une plaque soit enfin prête.

3.5 RÉPÉTABILITÉ DE LA TECHNIQUE

La répétition des gouttes a été estimée sur cinq puits en mesurant trois points par puits. Une sélection a été effectuée pour éliminer certains spectres aberrants afin de ne pas influencer de manière trop significative le RMS et le CV moyens. Nous avons d'abord observé le RMS et le CV sur les spectres entier (4000 à 600 cm⁻¹). Ensuite, le pic de la région entre 2400 et 1835 cm⁻¹, lié au dioxyde de carbone, a été supprimé étant donné qu'il faussait les résultats de manière trop significative. Enfin, nous avons sélectionné les spectres du « fingerprint » (1800 à 700 cm⁻¹). Les graphiques ci-après tiennent compte des résultats « fingerprint » uniquement étant donné qu'ils sont plus riches en information structurale. Les résultats de répétabilité mis en évidence par la moyenne quadratique (**RMS** : Figure 16) et le coefficient de variation (**CV** : Figure 17), ont montré que l'accumulation idéale de gouttes était au nombre de trois. Avec une moyenne quadratique de 0,020, les trois gouttes cumulées ont montrées des valeurs RMS les plus basses. Le coefficient de variation

a aussi dévoilé très clairement que la superposition de **trois gouttes** était plus stable par rapport à **deux gouttes** cumulées ou à **une goutte**.

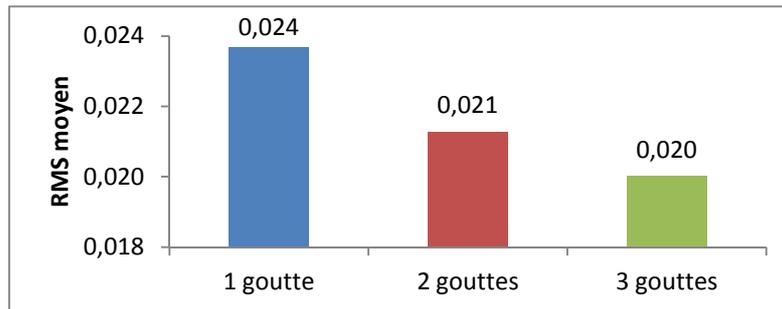


Figure 16 : RMS moyens sur les spectres du fingerprint sans CO₂ en fonction des gouttes cumulées

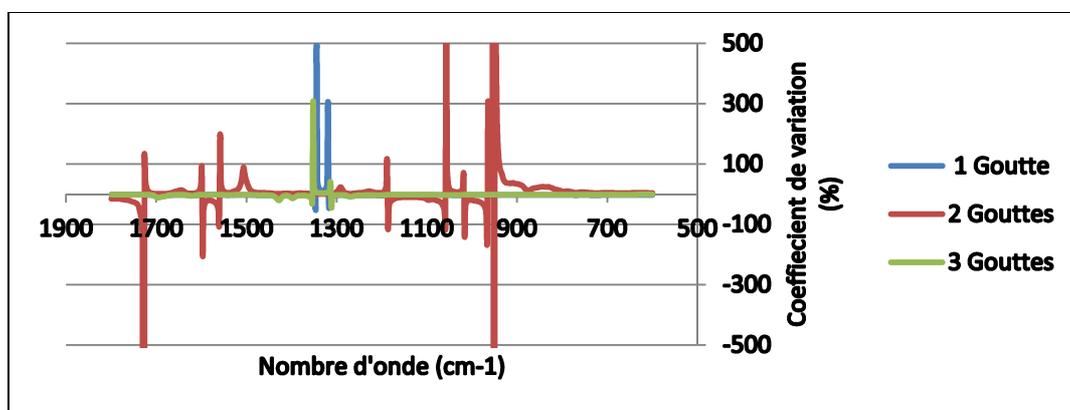
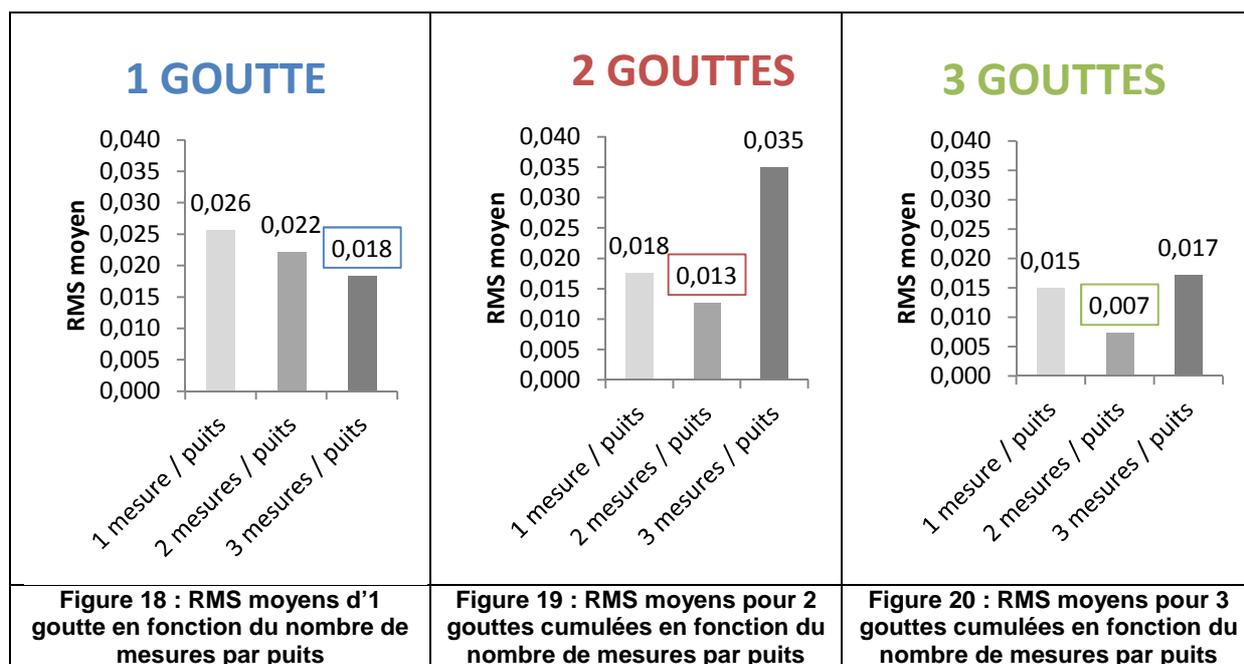


Figure 17 : Coefficient de variation des spectres fingerprint par gouttes cumulées sur la région de la fingerprint

Le RMS d'**une goutte** (Figure 19) a montré que **trois mesures** étaient nécessaires au sein d'un même puits. Pourtant le RMS avec **deux** ou **trois** gouttes cumulées est meilleur lorsque **deux mesures** sont prises par puits (Figure 20 et 21). Ces réponses étant trop approximatives, nous avons préféré effectuer la suite de nos analyses avec **trois gouttes** superposées en appliquant **trois mesures** par puits.



3.6 ANALYSES PAR SPECTROSCOPIE MIR DES MATIÈRES SÈCHES ET DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES

Suite à l'optimisation des paramètres de mesure sur l'acide gallique, tous les échantillons soumis à une analyse MIR sous forme d'extraits secs, ont été solubilisés dans un mélange binaire d'eau et d'éthanol à 50 % en vue d'obtenir des solutions de concentration égale à 500 ppm. Ils ont été déposés en trois couches de 25 μl sur les puits d'une microplaque en silicium (substrat transparent à la lumière infrarouge). Trois gouttes ont donc été superposées dans un même puits établissant ainsi l'épaisseur du dépôt. Afin d'obtenir un spectre moyen pour un même échantillon, la méthode a été effectuée en triple c'est-à-dire que pour chaque échantillon, trois répliques ont été réalisées pour tenir compte de la variabilité intra-variétale **entre les puits**. Après avoir acquis le spectre du background de l'air sur un puits vide de la microplaque (mesure de référence), trois mesures par échantillon ont été réalisées en déplaçant successivement chaque position d'échantillon vers la trajectoire du rayonnement IR. De cette manière, la variabilité qui peut exister **au sein d'un même puits** a pu être contrôlée.

Après avoir chargé la plaque à échantillons et l'avoir laissée sécher, elle a été placée sur le support d'un plateau motorisé. Toutes les mesures ont été prises à température ambiante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) avec un nombre de scans égal à 16 et une résolution de 4 cm^{-1} . La plage spectrale est comprise entre 4000 et 600 cm^{-1} mais nous avons coupé les spectres afin de

ne conserver que leur partie fingerprint, située entre 1800 et 700 cm^{-1} , riche en information structurale. L'acquisition de chaque spectre moyen a environ requis une quinzaine de secondes. Une fois les mesures prises, les échantillons ont été éliminés au moyen d'un chiffon imbibé d'éthanol (solvant très volatile) afin de ne laisser aucune trace lors de prochaines analyses.

Cette procédure a été initialement appliquée via l'utilisation du microscope moyen infrarouge et ensuite validée sur l'appareil de routine HTS-XT.

En parallèle, nous avons aussi réalisé des mesures en utilisant la réflexion totale atténuée ATR afin de faire le tandem avec le mémoire précédent réalisé par G. Compère à ce sujet ainsi que pour comparer les résultats obtenus avec les deux modes de mesure.

La démarche optimisée sur l'analyse de l'acide gallique a ensuite été appliquée aux matières sèches, aux extraits phénoliques, ainsi qu'aux standards polyphénoliques.

Pour réaliser cette opération, 10 mg de matière sèches, d'extraits et de standards phénoliques ont été solubilisés dans 20 ml le solvant 'éthanol-eau'. Une fois les solutions préparées, elles ont été conservées à l'abri de la lumière. Il a aussi été important de les préserver des trop fortes chaleurs.

Lors de la préparation des échantillons, il s'est avéré que les poudres de matières sèches et d'extraits phénoliques de chair, de pelure et de marc de pommes ne se sont pas solubilisées entièrement. Cela a empêché l'analyse quantitative de nos échantillons étant donné que nos solutions n'étaient pas complètement homogènes. C'est pourquoi un passage de trente minutes dans un bain à ultrason (la température du bain n'excédant pas 30°C) a été prescrit pour une solubilisation complète des standards phénoliques. Les agglomérats de molécules ou de particules de poudre ont été éclatés par la production de vibrations.

Les RMS (Figure 21) des matières sèches ont indiqué une variabilité entre 0,005 et 0,025 proche de celle de l'acide gallique. Par contre, les RMS des extraits phénoliques ont dévoilé principalement des écarts plus élevés oscillant entre 0,0045 et 0,0645.

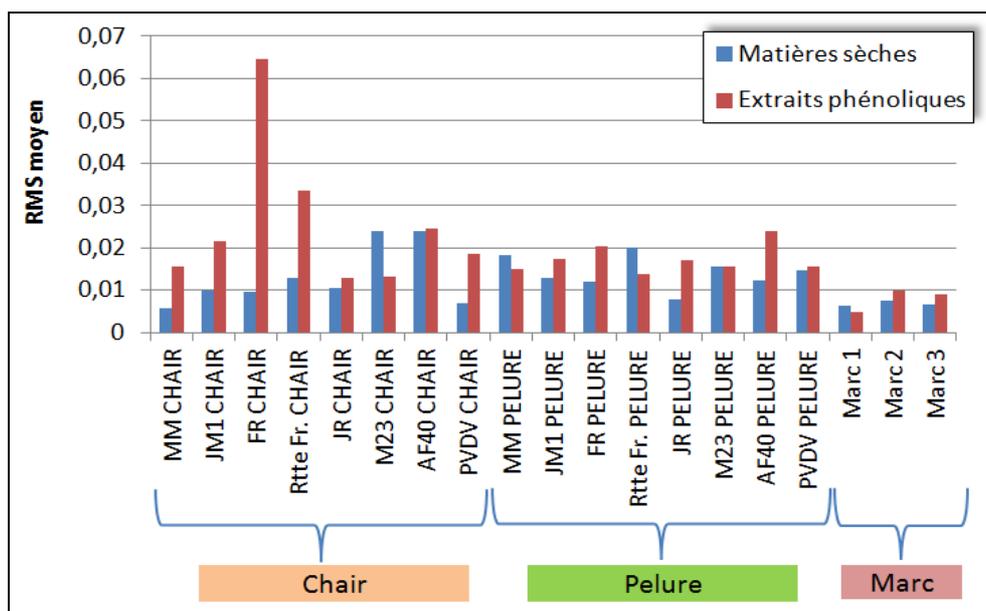


Figure 21 : RMS moyens des matières sèches et des extraits phénoliques

La variabilité plus élevée observée avec les extraits phénoliques peut être expliquée par le fait que les spectres sont riches de bandes plus résolues que ce que nous pouvons observer pour les matières sèches. Ces dernières présentent des bandes plus larges ce qui minimise les variations qui peuvent exister entre les différentes mesures. La Figure 22 présente un exemple de spectres d'extract phénolique et de matière sèche.

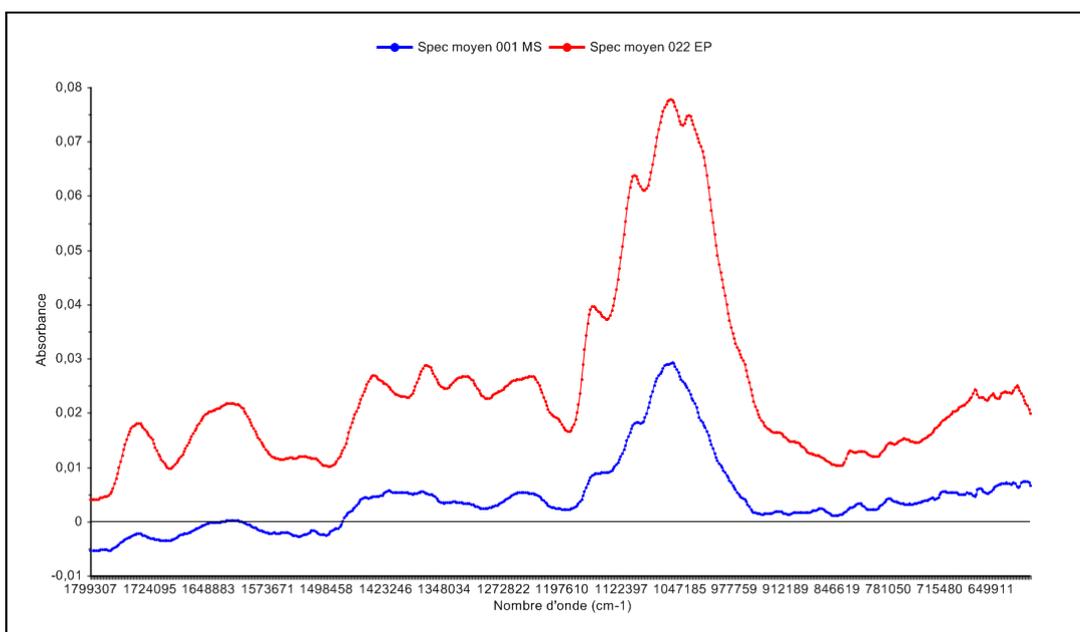


Figure 20 : Superposition des spectres fingerprint de la variété MM de matière sèche et d'extract phénolique

4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans un premier temps, la caractérisation physico-chimique des pommes a pu être effectuée et ces valeurs pourront être reliées à l'information spectrale caractérisant l'échantillon pour la suite du projet CAPPLE. Dans un second temps, plusieurs objectifs ont été atteints suite à l'analyse des spectres récoltés et ont fait ressortir deux résultats. Le premier concerne la discrimination entre, d'une part, les différents composants (chair ou pelure) et, d'autre part, les différentes variétés de pomme (de table ou cidricole). Le marc est un sous-produit de la variété cidricole, nous l'avons donc écarté des présentations graphiques de l'ACP. Le deuxième porte sur la caractérisation spectrale des composés phénoliques contenus dans les matières sèches, les extraits et les standards. De ces objectifs a, en définitive, découlé une méthode d'interprétation concernant l'identification du contenu polyphénolique des pommes.

4.1 CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES POMMES

Après avoir réalisé le tableau récapitulatif des résultats physico-chimiques par variété (Tableau 7), une interprétation de ces résultats a pu être effectuée. Avec une maturité s'élevant à 10, toutes les variétés sont à un stade de maturation très avancé. En effet, les pommes récoltées durant la saison 2012 ont été analysées après 6 mois de conditionnement. La fermeté moyenne variant entre 5 et 7 kg/cm², toutes les variétés, à l'exception de la variété AF40, sont restées relativement fermes. La teneur en sucre de ces huit variétés s'étend de 11,9 à 21,8 °Brix. L'acidité titrable se distingue en fonction des variétés : les variétés cidricoles sont moins riches en acide malique, tandis que les variétés de table, à l'exception de la variété AF40, sont plus riches aux alentours de 8 équivalents d'acide malique.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats moyens obtenus lors des analyses de référence

	Variété	Maturité (échelle de 1 à 10)	Fermeté moyenne (kg/cm ²)	Teneur moyenne en sucre (°Brix)	Acidité (éq. g d'acide malique / l)
Variétés de table	JM1	10	6	14,8	7
	PVDV	10	7	15,8	9
	M 23	10	6	15,4	8
	Rtte Fr	10	5	16,2	8
	AF40	10	2	11,9	3
Variétés cidricoles	MM	10	5	17,6	3
	FR	10	7	14,8	2
	JR	10	6	21,8	3

4.2 ESTIMATION DE LA TENEUR EN POLYPHÉNOLS TOTAUX PAR FOLIN-CIOCALTEU

Après avoir effectué la moyenne des résultats de concentrations par variété (Tableau 8), nous avons pu les interpréter.

Quelle que soit la variété de pommes, toutes les pelures se sont trouvées plus concentrées en polyphénols totaux que les chairs. La variabilité **inter**-variétale a été relativement marquée étant donné que la concentration des variétés cidricoles est toujours plus élevée que celle des variétés de table. Une certaine variabilité **intra**-variétale a également pu être perçue. Au sein des variétés de table, la teneur de la variété AF40 s'est montrée légèrement inférieure aux autres tandis que les variétés JM1 et M23 sont plus au moins comparables ainsi que les variétés PVDV et Rtte Fr. Remarquons tout de même que JM1 (variété issue du programme d'amélioration) est très intéressante vu ses hautes teneurs aussi bien dans la chair que dans la pelure. Les concentrations des variétés cidricoles se sont révélées plus spécifiques mais nous avons observé que la variété JR possédait des valeurs supérieures aux autres et se révélait être la championne en termes de composition phénolique.

Tableau 8 : Tableau des résultats de concentration obtenus lors de l'analyse des polyphénols totaux sur les matières sèches

	Variété	C°PPH de CHAIR ($\mu\text{g} / \text{g MS}$)	C°PPH de PELURE ($\mu\text{g} / \text{g MS}$)
Variétés de table	JM1	13967	23082
	PVDV	7448	19541
	M 23	11062	19067
	Rtte Fr	7482	16073
	AF40	3683	6093
Variétés cidricoles	MM	23251	34236
	FR	20280	25513
	JR	36602	43461

Pour les échantillons de marc, on voit bien la diminution entre le marc de départ 1 et le finale marc 5. Il y a surtout une nette diminution de polyphénols totaux entre les marcs 3 et 5. Entre les marcs 1 et 3, la diminution est moins marquée.

Tableau 8 : Suite des résultats de concentration obtenus lors de l'analyse des polyphénols totaux sur les matières sèches

C°PPH de MARC (µg / g MS)	Marc 1	12418
	Marc 3	11498
	Marc 5	4062

Ces échantillons correspondent à des stades différents de processus de préparation du marc. Nous pouvons ainsi conclure sur l'évolution du contenu phénolique au cours du process de production du marc.

4.3 DISCRIMINATION DES COMPOSANTS ET DES VARIÉTÉS DE POMMES

Tout d'abord, deux matrices basées sur les spectres des matières sèches et extraits phénoliques, ont été créées. Au sein de ces deux matrices, plusieurs catégories ont été générées distinguant la chair et la pelure des pommes de table et des pommes cidricoles. Le diagramme de ces différentes catégories créées est présenté sur la Figure 23.

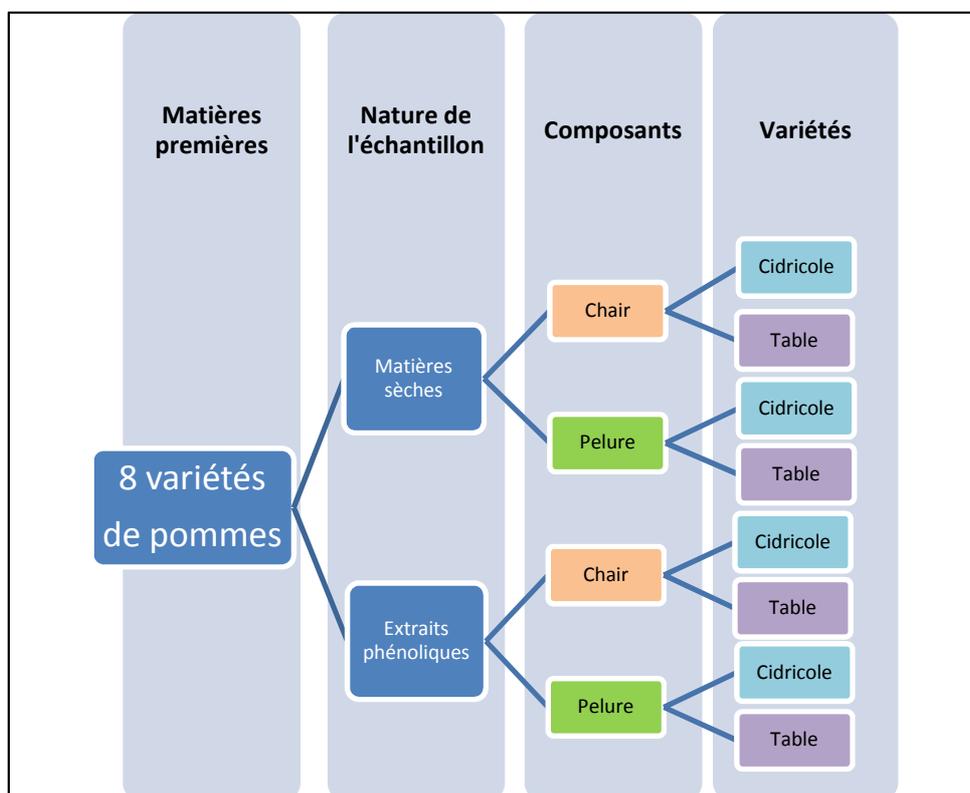


Figure 23 : Digramme des catégories créées en vue d'une discrimination des composants et variétés des pommes étudiées

Une première ACP a d'abord été réalisée sur la totalité du spectre, s'étalant de 4000 à 600 cm^{-1} afin d'étudier s'il était possible de discriminer les différentes variétés de pommes et/ou leur composants. Ensuite, nous avons ciblé la région fingerprint (allant de 1800 à 700 cm^{-1}) pour effectuer une seconde ACP. Pour chaque catégorie d'échantillons, les spectres MIR ont subi des prétraitements (une SNV, une dérivée première ou les deux) avant d'être sujets à une Analyse en Composantes Principales ACP. Après avoir sélectionnées les meilleures discriminations en fonction de leur traitement ou non (Annexe VI), nous avons observé qu'une Dérivée I et une SNV étaient quasiment toujours nécessaires pour discerner au mieux les différentes catégories. Les tableaux pages 45 à 46 montrent les douze ACP sélectionnées.

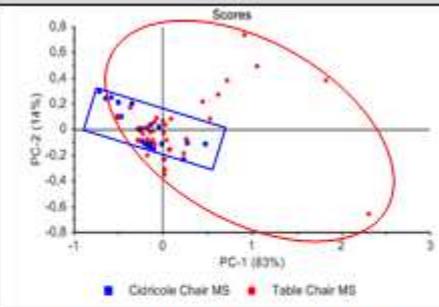
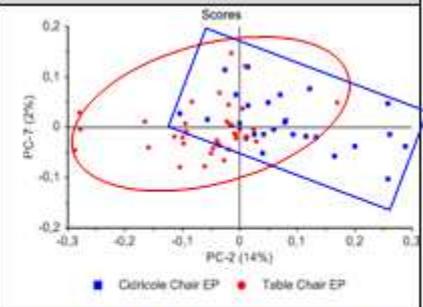
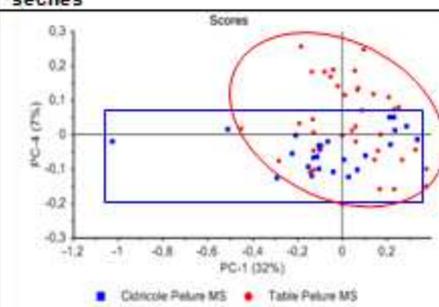
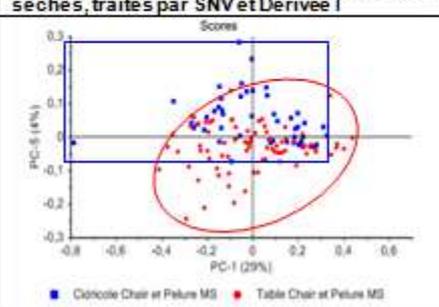
4.3.1 DISCRIMINATION DES COMPOSANTS DE POMMES (CHAIR VS PELURE)

Le tableau ci-joint reprend les discriminations des composants de pommes en fonction des différentes variétés de pomme, des matières sèches et des extraits phénoliques.

Variété(s)	Matière sèche	Extrait phénolique
Cidricole	<p>Figure 23 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-4) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches</p>	<p>Figure 24 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I</p>
Table	<p>Figure 25 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-3) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches, traités par SNV et Dérivée I</p>	<p>Figure 26 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-5) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I</p>
Cidricole et table	<p>Figure 27 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches</p>	<p>Figure 28 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-7) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I</p>

4.3.2 DISCRIMINATION DES VARIÉTÉS DE POMMES (CIDRICOLE VS TABLE)

Le tableau ci-joint reprend les discriminations des variétés de pomme en fonction des différents composants, des matières sèches et des extraits phénoliques.

Composant(s)	Matière sèche	Extrait phénolique
Chair	 <p>Figure 29 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches</p>	 <p>Figure 30 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-7) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I</p>
	Pelure	 <p>Figure 31 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-4) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches, traités par SNV et Dérivée I</p>
Chair et Pelure		 <p>Figure 33 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-5) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches, traités par SNV et Dérivée I</p>

L'ensemble des variétés cidricoles s'est réparti essentiellement dans le quadrant supérieur droit, correspondant à la combinaison des coordonnées positives pour la troisième et la sixième composante. À l'opposé, la majorité des variétés de table s'est retrouvée dans le quadrant inférieur gauche, faisant référence à la combinaison des coordonnées négatives pour la troisième et la sixième composante.

4.4 CARACTÉRISATION SPECTRALE DES STANDARDS PHÉNOLIQUES

La superposition des spectres des douze standards du Tableau 9 ont facilité le recensement des nombres d'onde de chaque pic des spectres **ATR** (sous forme de poudre) et des spectres **HTS** (sous forme d'extrait sec). Des différences d'intensité ont eu lieu dû à la différence d'énergie traversée dans chaque dispositif (l'énergie atteignant l'échantillon en mode de transmission est plus élevée qu'en mode de réflexion atténuée) en plus de la forme de l'échantillon analysé (poudre dans le cas de l'ATR et extrait sec dans le cas de l'HTS). (photos en Annexe VIII). Pour une meilleure présentation et superposition des spectres nous avons remis ces deniers à la même échelle.

Tableau 9 : Superposition des spectres des standards **ATR** (poudres) et **HTS** (extraits secs)

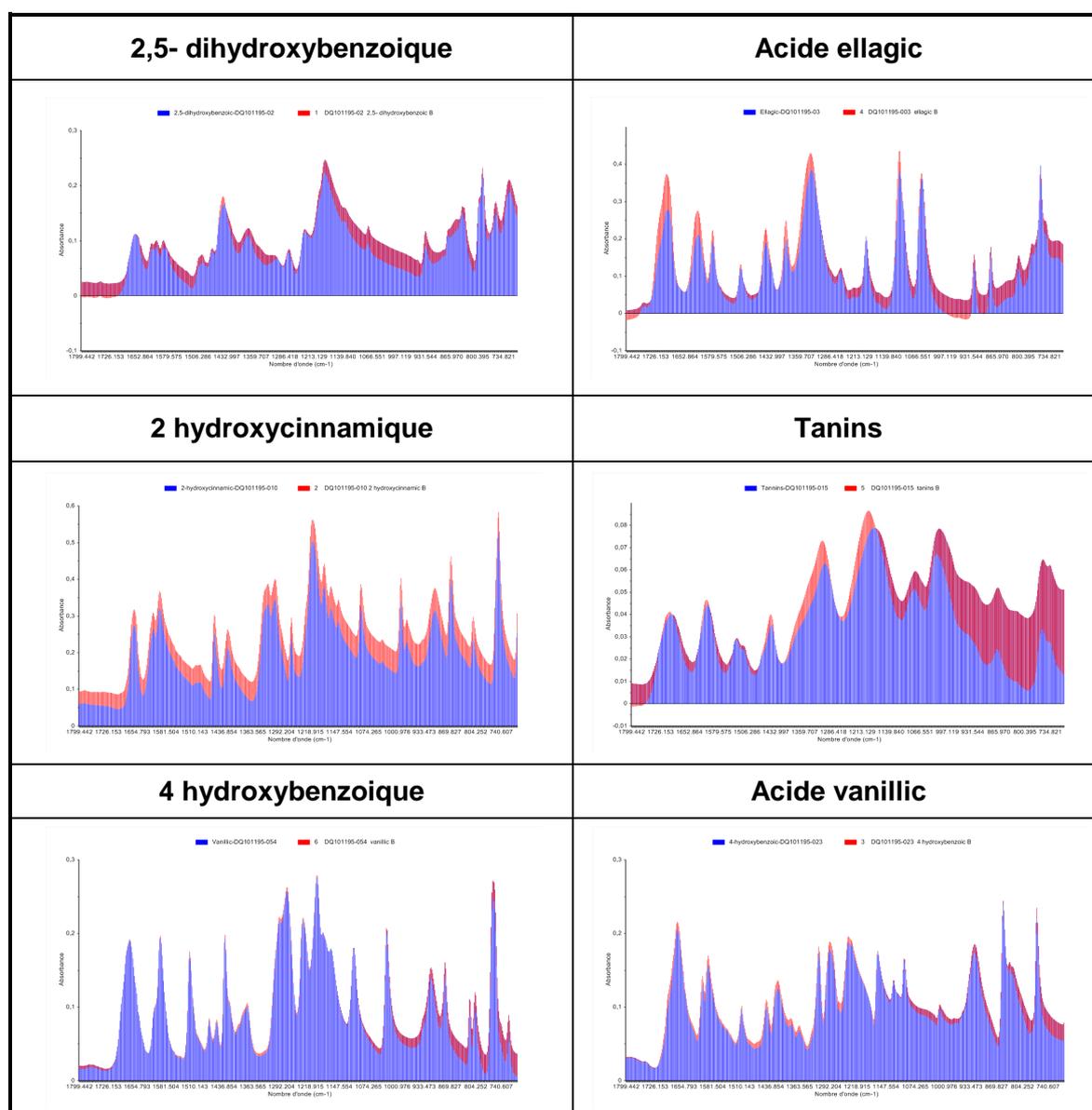
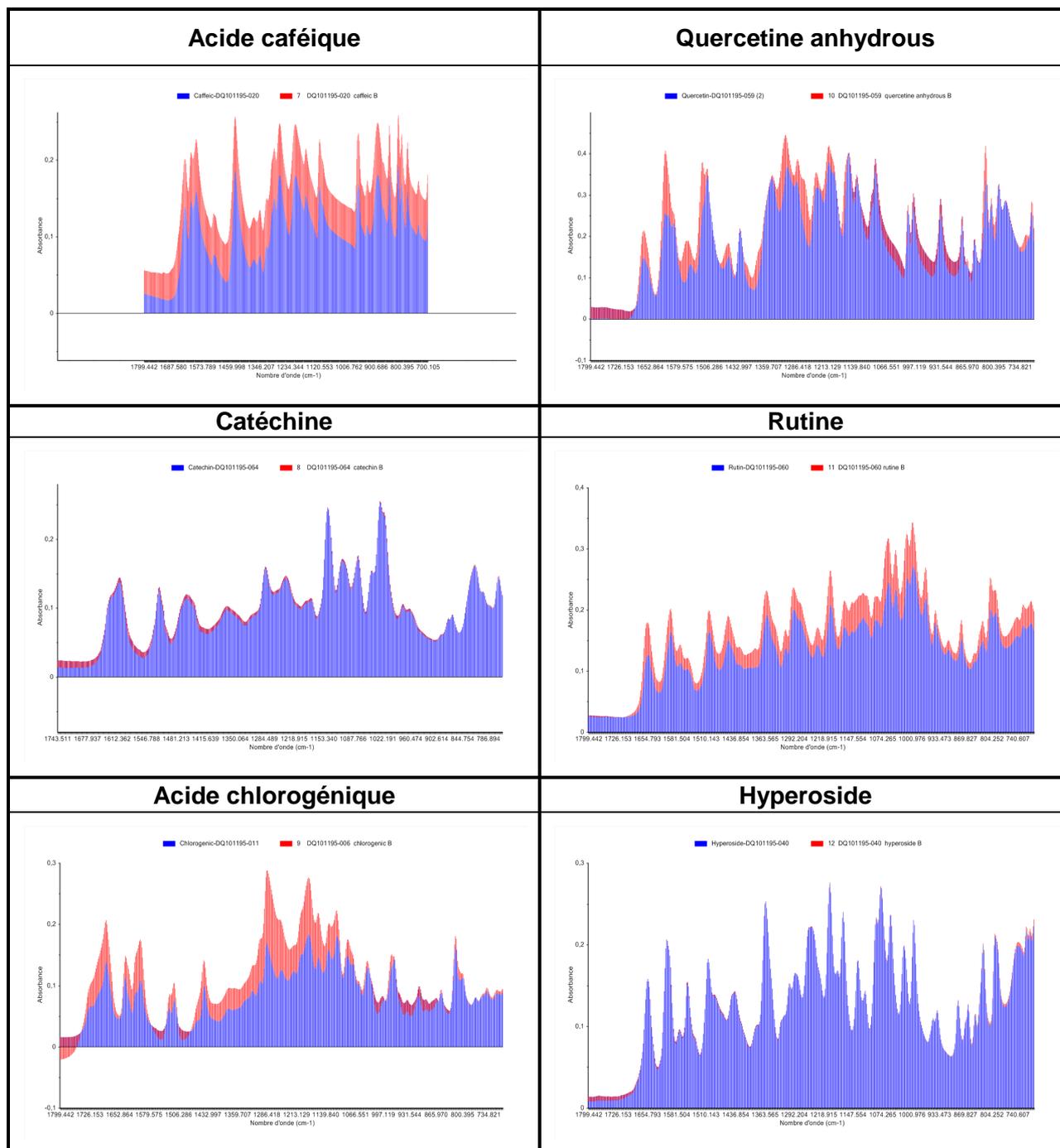


Tableau 9 (suite) : Superposition des spectres des standards ATR (poudres) et HTS (extraits secs)

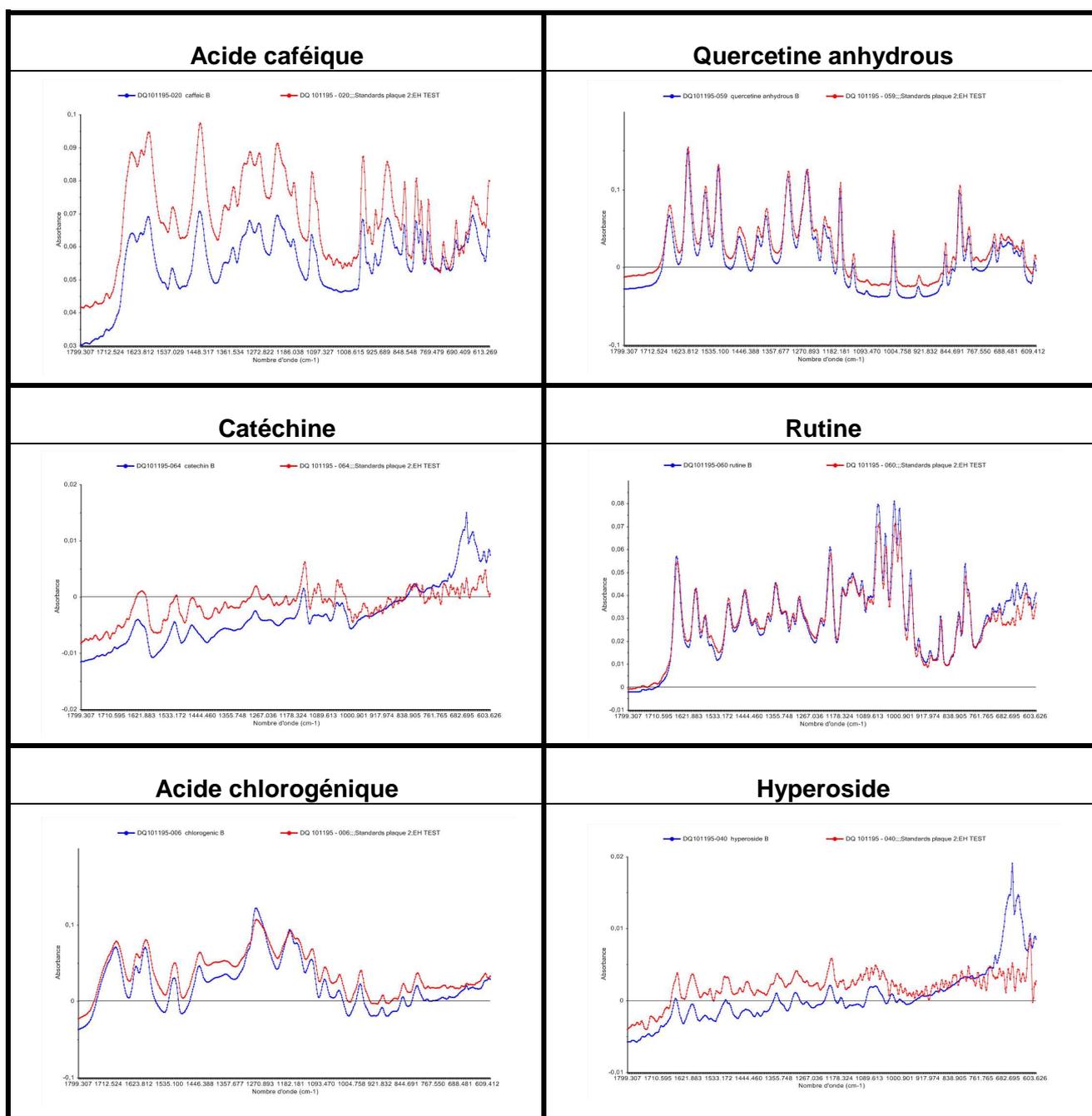


Comme nous pouvons le constater sur les figures ci-dessus, quasi tous les pics se sont retrouvés dans les deux modes d'acquisition spectrale. Il n'y a donc presque pas de perte d'information. Les informations spectrales provenant des analyses en mode de réflexion ou de transmission sont équivalentes.

4.5 VALIDATION DU PROTOCOLE DE L'ANALYSE EN TRANSMISSION SUR L'HTS

Afin de valider cette optimisation sur un appareil destiné à l'industrie, nous avons superposé les spectres des standards et des échantillons obtenus par le microscope **Hypérior 3000** avec ceux obtenus par l'appareil **HTS-XT**. La superposition des spectres a montré des concordances tant, au niveau de la présence des pics que au niveau de l'intensité.

Tableau 10 : Superposition des spectres mesurés avec l'Hypérior et avec l'HTS.



4.6 IDENTIFICATION DU CONTENU POLYPHÉNOLIQUE DES POMMES : **CARACTÉRISATION SPECTRALE DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES**

Les pics présents dans les spectres obtenus à partir des matières sèches, des extraits et des standards phénoliques ont été recensés en vue d'établir les zones spectrales caractéristiques des composés. Ainsi, les pics identifiés dans les spectres mesurés pour les sept standards (6 spectres mesurés par l'HTS et 1 spectre mesuré par l'ATR (épicatchine)) ont été associés à des fonctions chimiques sur base des gammes de nombre d'onde correspondant aux acides phénoliques.

Un tableau de caractérisation des standards phénoliques a été établi précédemment au cours du stage de G. Compère durant l'année universitaire 2011-2012. Le profil de chaque standard a été déterminé essentiellement au moyen du livre *Infrared Characteristic Group Frequencies* de Socrates G., 1997 (John Wiley & Sons). Nous nous baserons sur ce dernier pour caractériser nos extraits phénoliques. Ce tableau est présenté en Annexe IX.

Le recensement du positionnement des pics à tel ou tel nombre d'onde (Tableau 11) nous a permis de soumettre une hypothèse quant au contenu phénolique de nos échantillons de composition inconnue. Notre interprétation a pu être confrontée avec les résultats UPLC obtenus du Celabor.

Le Tableau 12 a montré que les trois composants (chair, pelure et marc) ont eu six pics (1737, 1371, 1320, 1105 et 1035, 829 et 779 cm^{-1}) en commun. Tandis que la chair et la pelure se voient partager trois pics (1623, 1334, 1157 cm^{-1}). Les deux variétés JR et PVDV chair partage le pique 1334 cm^{-1} tant pour la chair que pour la pelure. Par contre certains pics se sont démarqués au sein d'un même composant. En effet, les chairs ont deux pics spécifiques : 1520 et 1201 cm^{-1} , tandis que les pelures en ont également deux différents : 1236 et 719 cm^{-1} . Les trois marcs ont certains pics qui se sont différenciés des autres tels que 1531, 1430, 1421 et 1054 cm^{-1} .

Quelques standards (Tableau 13) ont montré des concentrations (UPLC) bien particulières pour certaines variétés ou certains composants. L'acide caféique, par exemple, ne se trouve que dans le marc de pomme 1. Le pic 1531 cm^{-1} ne se repérant que dans cet acide nous pourrions émettre l'hypothèse que ce pic caractérise le marc. L'acide chlorogénique est présent dans tous les composants. Ainsi, les pics communs aux trois composants sont peut-être caractéristiques de cet acide. La catéchine, la rutine et l'hyperoside se trouvent uniquement dans les variétés de pelures à des concentrations plus

au moins comparables. Les pics prédominants des pelures seraient caractérisés par ces trois standards ainsi que la quercétine pour 3 variétés de pelure seulement. Les trois marcs ont deux standards communs (la rutine et l'hyperoside) en concentration plus au moins stable quelque soit le moment du prélèvement. Le pic 779 cm^{-1} retrouvé dans l'épicatéchine se présente dans tous les extraits phénoliques et l'épicatéchine est en effet présent dans tous les extraits en concentration majoritaire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons testé le potentiel de la spectroscopie MIR en tant que technique d'identification du profil en composés phénoliques de matrices végétales, le but de cette opération étant de mettre au point un procédé rapide et simple d'évaluation de la qualité de végétaux. En effet, la connaissance de la composition d'un aliment est primordiale pour exploiter au maximum les qualités de ce dernier.

Il s'est avéré que la spectroscopie MIR reste un outil potentiel pour la caractérisation de molécules chimiques telles que les composés phénoliques mais qui gagnerait à être développé. En effet, les spectres mesurés pour chacun des composants et des variétés sont spécifiques, mais cela n'est pas complètement mis en avant par leur analyse en ACP. Ces premiers résultats sont encourageants mais nécessitent le développement de plus larges bases de données afin de mettre en évidence les différences qui peuvent exister entre composants des pommes et/ou leurs variétés.

Pour comprendre les conditions dans lesquelles évoluent les composés phénoliques dans les pommes, nous avons travaillé sur des solutions préparées à base de chair de pelure et de marc de pomme. La méthode des extraits secs (c'est à dire la mesure du résidu phénolique après évaporation du solvant), est prometteuse car elle permet d'étudier des solutions de faibles concentrations. En effet, elle permet l'analyse de solutions ayant une concentration de l'ordre de 500 ppm. Les autres paramètres, jugés optimaux pour la mesure des spectres en transmission (sur le microscope), sont : un nombre de scans égal à 16, une résolution de 4 cm^{-1} , la prise d'un nouveau background entre chaque variété et le dépôt de $75 \mu\text{l}$ d'échantillon sur les puits de la microplaque. Les extraits phénoliques ont été mesurés sous forme d'un extrait sec après une solubilisation, dans une solution binaire à base d'éthanol et d'eau à 50%. Les traitements de données spectrales ont été réalisés sur la région du spectre, qui s'étend de 1800 à 700 cm^{-1} , appelée « fingerprint ». La solubilisation des composés est importante car elle permet de mimer les conditions et le comportement des composés phénoliques dans les végétaux puisque ceux-ci y sont sous forme soluble.

Avant d'étudier des échantillons, nous avons validé l'hypothèse de répétabilité de la méthode. Les spectres ont montré une superposition satisfaisante et n'impliquent pas des variations trop significatives. Les coefficients de variation et les valeurs RMS plus élevés pour les extraits phénoliques que pour les matières sèches. Par ailleurs, la reproductibilité de la méthode reste encore à vérifier.

Nous avons également pu mettre en évidence que l'environnement de la plaque lors du séchage des gouttes est source de variabilités. En effet, l'environnement influence directement le processus d'évaporation du solvant 'éthanol-eau'. Lorsque le séchage des gouttes a lieu sous une hotte à flux d'air, l'extrait sec se concentre sur une partie du puits, ne s'étalant pas convenablement sur toute la surface. Mais malgré le fait que l'analyse des composés solubilisés se soit faite à l'air ambiant, nous avons observé des inégalités entre les standards. Celles-ci peuvent être dues, au delà de la structure chimique, à la stabilité, la cristallisation et la recristallisation des molécules au moment du séchage.

Les spectres des poudres de standards directement analysées via le spectromètre ATR ont été mis en parallèle avec ceux des extraits secs mesurés en transmission pour mettre en évidence la qualité et la quantité des données spectrales enregistrées en mode de transmission.

Malgré que les profils en composés phénoliques présents dans les pommes soient fortement influencés d'une part par les conditions de culture, le stade physiologique de la plante, etc., et d'autre part par le patrimoine génétique de la pomme, une interprétation (non automatisée) a été possible. Les échantillons de matières sèches n'ont pas été pris en compte étant donné qu'il existe un effet matrice plus important que dans les extraits phénoliques. L'effet matrice est le résultat de la présence de protéines, sucres, etc., qui pourrait interférer avec l'identification des composés phénoliques.

Sur base des régions spectrales sélectionnées (fingerprint), nous avons tenté de mener une analyse qualitative d'échantillons de pomme consistant à s'assurer de l'expression des différents composés phénoliques présents dans les extraits. L'analyse a permis de valoriser le contenu phénolique des pommes mais n'a pas permis de distinguer leurs contenus de façon individuelle. Les similitudes entre les pics d'une variété et la concentration des composés phénoliques sont difficiles à mettre en évidence. Il serait nécessaire créer un programme informatique permettant d'obtenir des résultats plus sélectifs.

Cette étude peut être considérée comme un travail fondamental pour mettre au point une méthode de détection et d'identification des composés phénoliques présents dans une matrice végétale complexe telle que la pomme.

En ce qui concerne l'analyse de matrices équivalentes, il est encore nécessaire de préparer des mélanges synthétiques. L'analyse et l'interprétation de mélanges de synthèse permettraient de mettre au point une technique de caractérisation spectrale de ces mélanges. Les informations, obtenues grâce à la caractérisation des standards qui sont à la

base des mélanges, permettraient de caractériser nos échantillons en faisant un lien entre les régions spectrales et les fonctions chimiques retrouvées dans les composés phénoliques. Ainsi, des mélanges de standards seraient confrontés à l'analyse des matières sèches et des extraits végétaux de chair, de pelure et de marc de pomme.

Comme perspectives pour ce travail et dans le but d'améliorer la méthode, il serait intéressant de valider et éventuellement adapter la technique de mesure des matières sèches et des extraits phénoliques en effectuant les analyses sur l'appareil HTS-XT.

La méthode mise au point permettrait une étude qualitative du profil en composés phénoliques à visée industrielle d'analyses en ligne. L'analyse plus approfondie des spectres, notamment concernant les valeurs d'absorbance, pourrait ouvrir la voie à une analyse quantitative permettant de valoriser les marcs de pommes par exemple (sous-produit industriel).

Finalement, avant de valider définitivement cette méthode, il conviendrait de la tester sur des échantillons d'extraits végétaux différents.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Publications

Afseth, Nils K., Martens H., Randby Å., Gidskehaug L., Narum B., Jørgensen K., Lien S., Kohler A., 2010. *Predicting the Fatty Acid Composition of Milk: A Comparison of Two Fourier Transform Infrared Sampling Techniques*. Volume 64, Issue 7, pp. 700-707(8)

Awad A. M., Wagenmakers S. P., de Jager A., 2001. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae* 88, 4 : 289-298

Ceymann M., Arrigonia E., Schärer H., Bozzi Nisinga A., Hurrellb R. F., 2012. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis* : doi:10.1016/j.jfca.2011.12.002

El Gharras H. 2009. Polyphenols : food sources, properties and applications – a review. *International journal of food science & technology* 44 : 2512-2518

Faller A.L.K. et Fialho E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of food composition and analysis* 23 : 561-568

Guyot S., Marnet N., Laraba D., Drilleau J.-F., 1998. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien), *J. Agric. Food Chem.*, 46 (5):1698-1705, DOI: 10.1021/jf970832p

Jakopica¹ J., Slatnara¹ A., Stampara¹ F., Veberica¹ R. and Simoncica A. 2011. Analysis of selected primary metabolites and phenolic profile of 'Golden Delicious' apples from four production systems. *Cirad/EDP Sciences* : doi:10.1051/fruits/2012032 : Vol.67 : 377-386

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rékika, D., Yang, R., Charles, M.T., et Rupasinghe, H.P.V. 2009. Advances in Fruit Breeding In Eastern Canada - Role of Phytochemicals in Designing Specialty Fruits. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 814, 205-208.

Kumar A., Chauhan G. S. 2010. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers* 82 : 454-459

Lu Y., Yeap Foo L. 1996. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food chemistry* 59 : 187-194

Merzlyak MN, Solovchenko AE, Smagin AI, Gitelson AA 2005. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology*. 162 (2) : 151-60

Queji M.D., Wosiacki G., Cordeiro G. A., Peralta-Zamora P. G., Nagata N. 2009. Determination of simple sugars, malic acid and total phenolic compounds in apple pomace by infrared spectroscopy and PLSR. *Institute of Food Science and Technology* : doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02173.x

Shapaval V., Moretro T., Suso H. P., Asli A. W., Schmitt J., Lillehaug D., Martens H., Böcker U., Kohler A. 2010. A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of biophotonics* 3 (8-9): 512-21: PMID: 20414905 DOI: 10.1002/jbio.201000014

Telli A., Mahboub N., Boudjeh S, Siboukeur O. E. K. et Moulti-Mati F. 2010. Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées. *Annales des Sciences et Technologie*. 2, N°2

Yuri J. A. , Neira A. , Quilodran A., Motomura Y. and Palomo I. 2009. Antioxidant activity and total phenolics concentration in apple peel and flesh is determined by cultivar and agroclimatic growing regions in Chile. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 7 (3&4) : 513 - 517

- Livres

Bertrand D. & Dufour E. et al., « La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques », 2^e édition, Lavoisier, Ed. TEC & DOC, Coll. Sciences & techniques agroalimentaires.

Valeur B., Lumière et luminescence, ces phénomènes lumineux qui nous entourent, Belin pour la science, 2007, 25

Dyer J. R., Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques, Fondements de la chimie moderne, DUNOD, Paris, 1970, 27

Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Introduction to spectroscopy, Departement of chemistry, Western Washington University, 2^e éd., 1996, 24

Sarni-Manchado P., Cheynier V. et cie. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed TEC&DOC. Lavoisier collection sciences & techniques agroalimentaire, 398

- **Sites internet**

RÉDIGER UNE BIBLIOGRAPHIE, BERNAD POCHET
<http://users.skynet.be/abel.debrue/textes/rech-doc/bibliogr.pdf> Février 2013

POLYPH DE POMME ET DE CIDRE
<http://www.sfa-site.com/?q=node/267ENOLS>

OUTILS STATISTIQUES POUR L'ANALYSE : TESTS STATISTIQUES, STUDENT, FISCHER SNEDECOR, PRÉCISION, EXACTITUDE.
<http://www.technolabo.ma/TL1-3.pdfbe/>. Février 2013

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER
<http://www.biophyresearch.com/pdf/ftir.pdf>. Février 2013

DE LA POMME À LA POMME TRANSFORMÉE : IMPACT DU PROCÉDÉ SUR DEUX COMPOSÉS D'INTÉRÊT NUTRITIONNEL : CARACTERISATION PHYSIQUE ET SENSORIELLE DES PRODUITS TRANSFORMES. p.12 et p.41, Thèse de Muriel COLIN-HENRION
http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/35/11/79/PDF/These_Muriel_RectoVerso.pdf. Février 2013

IDENTIFICATION DE POLYPHÉNOLS, ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES
<ftp://ftp.scd.univ-metz.fr/pub/Theses/2010/Muanda.Francois.Nsemi.SMZ1011.pdf> p. 56.
Février 2013

LE PORTAIL DE LA SCIENCE. SANTÉ : LES POLYPHÉNOLS PASSENT À TABLE
<http://www.science.gouv.fr/fr/dossiers/bdd/res/2573/sante-les-polyphenols-passent-a-table/>.
Février 2013

COMPOSÉS DES FRUITS D'INTÉRÊT NUTRITIONNEL: IMPACT DES PROCÉDÉS DE TRANSFORMATION SUR LES POLYPHÉNOLS.
http://www.revuevitiarbohorti.ch/artikel/2011_06_f_240.pdf. Mars 2013

- **Autres**

Berken P-Y. Cours de chimie-physique 3TGA IAA, Haute Ecole Charlemagne Communauté française, Institut supérieur Industriel Agronomique Huy, Année académique 2012-2013 : U.M. V / FSR/ Master sciences analytiques/ M9 / Cours de Spectroscopie Infrarouge/ A. EL HAJJI & S.ZAYDOUN

Compère G. 2011. Mise au point d'une méthode basée sur la spectroscopie moyen infrarouge pour la détection et l'identification des composés phénoliques. Mémoire

Dumont S. 2010. Contribution à la mise au point d'une technique d'analyse non destructive, par spectroscopie infrarouge, des principes utiles contenus dans les pommes à cidres en verger. Mémoire

Mirouze L. & De F. 1992, Thèse : Analyse quantitative en spectrométrie moyen infrarouge par transformée de Fourier : perspectives d'application dans le domaine agro-alimentaire, Université Lille1 Sciences et Technologies, BP 30155 59653 VILLENEUVE D'ASCQ

Smal N. Cours de chimie appliquée 3TGA, Haute Ecole Charlemagne Communauté française, Institut supérieur Industriel Agronomique Huy, Année académique 2012-2013

ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
AF 40*	*Variété de pomme d'amélioration
ATR	Réflexion Totale Atténuée (Attenuated Total Reflection)
CRA-W	Centre wallon de Recherches Agronomiques
CV	Coefficient de variation
EP	Extraits Polyphénols
ES	Extraits Secs
Et al.	<i>Et alii</i> (= et les autres)
FR	Frequin Rouge
FT-IR	Infrarouge à Transformée de Fourier
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HTS	Criblage à haut débit (High Throughput Screening)
JM1*	*Variété de pomme d'amélioration
JR	Jeanne Renard
MCP	Moindres Carrés Partiels
MIR	Moyen infrarouge (Mid infrared)
MM	Marie Menard
M 23	La Bazadaise
MS	Matières Sèches
PVDV	Président Van Dievoet
PIR / NIR	Proche infrarouge (Near infrared)
RMS	Moyenne quadratique (Root Mean Squarre)
Rtte Fr	Reinette de France
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra Performance

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structures chimiques des acides phénoliques dosés par le Celabor et le CRA-W	6
Tableau 2 : Table des combinaisons entre les régions du spectre moyen infrarouge et des liaisons chimiques	15
Tableau 3 : Liste des standards analysés en transmission au microscope	20
Tableau 4 : Tableau reprenant tous les volumes des différentes solutions ajoutées.....	26
Tableau 5 : Optimisation de la nature du solvant.....	28
Tableau 6 : Volumes nécessaires pour l'optimisation de la concentration de la solution.....	29
Tableau 7 : Accumulation optimale de goutte par puits.....	30
Tableau 8 : Suite des résultats de concentration obtenus lors de l'analyse des polyphénols totaux sur les matières sèches	37
Tableau 9 : Superposition des spectres des standards ATR (poudres) et HTS (extraits secs)	41, 42
Tableau 10 : Superposition des spectres mesurés avec l'Hypérion et avec l'HTS.....	43
Tableau 11 : Recensement des gammes spectrales caractéristiques des extraits phénoliques.....	46
Tableau 12 : Recensement des gammes spectrales caractéristiques des composés phénoliques.....	46
Tableau 13 : Résultats de concentration en composés phénoliques de chaque extrait phénolique (obtenus par UPLC).....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Spectre électromagnétique.....	9
Figure 2 : Énergie potentielle de liaison en fonction de la distance internucléaire	10
Figure 3: Illustration des vibrations d'une fonction chimique de type méthylène	11
Figure 4 : Principe de la transmission.....	12
Figure 5 : Spectre MIR d'un standard d'acide gallique sous forme d'extrait sec	16
Figure 6 : Succession des échantillons et des analyses réalisées sur chacun d'eux	18
Figure 7 : Spectromètre VERTEX 70 (à l'extrême gauche) couplé avec le microscope HYPERION 3000 et le module à extension HTS-XT (au centre), suivi de l'ordinateur (à l'extrême droite).....	21
Figure 8 : Micro plaque insérée dans le tiroir motorisé	21
Figure 9 : Schéma d'une vue aérienne du spectromètre VERTEX 70	22
Figure 10 : Schéma d'une coupe transversale du microscope HYPERION 3000	22
Figure 11 : Photo du spectromètre VERTEX 70 (à gauche)	22
Figure 12 : XDS (FOSS NIRSystems, Inc.)	25
Figure 13 : PHAZIR (Polychromix, Inc.) 1000 – 1800 nm (NIR uniquement)	25
Figure 14 : Photo d'un extrait sec de quercétine correctement réparti sur la surface du puits	29
Figure 15 : Photo d'un extrait sec d'acide caféique qui a cristallisé sur la surface du puits.	29
Figure 16 : RMS moyens sur les spectres du fingerprint sans CO ₂	31
Figure 17 : Coefficient de variation des spectres fingerprint par gouttes cumulées sur la région de la fingerprint	31
Figure 18 : RMS moyens d'1 goutte en fonction du nombre de mesures par puits	32

Figure 19 : RMS moyens pour 2 gouttes cumulées en fonction du nombre de mesures par puits.....32

Figure 20 : RMS moyens des matières sèches et des extraits phénoliques34

Figure 21 : Superposition des spectres fingerprint de la variété MM de matière sèche et d'extrait phénolique.....34

Figure 22 : Digramme des catégories créées en vue d'une discrimination des composants et variétés des pommes étudiées.....38

Figure 23 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches.....39

Figure 24 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-4) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques.....39

Figure 25 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches.....39

Figure 26 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-5) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I.....39

Figure 27 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches.....39

Figure 28 : Résultat de l'ACP (PC-3 vs PC-6) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I.....39

Figure 29 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches.....40

Figure 30 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-4) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I.....40

Figure 31 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-4) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches, traités par SNV et Dérivée I.....40

Figure 32 : Résultat de l'ACP (PC-2 vs PC-6) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I.....40

Figure 33 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-5) appliquée sur les spectres MIR des matières sèches, traités par SNV et Dérivée I.....40

Figure 34: Résultat de l'ACP (PC-3 vs PC-6) appliquée sur les spectres MIR des extraits phénoliques, traités par SNV et Dérivée I.....40

