



**Université catholique de Louvain**  
**Faculté d'ingénierie biologique, agronomique**  
**et environnementale**



**Centre wallon de Recherches agronomiques**

# Mise au point d'une méthode basée sur la spectroscopie moyen infrarouge pour la détection et l'identification des composés phénoliques

---

Promoteurs :

Prof. Yvan Larondelle

Dr. Ir. Vincent Baeten

Encadrante :

Dr. Ouissam Abbas

Mémoire présenté par Géraldine Compère

en vue de l'obtention du diplôme de Master

bioingénieur : sciences agronomiques, option :

Sciences, technologie et qualité des aliments.

2011-2012



# RÉSUMÉ

Afin d'apporter une plus-value aux matrices végétales et à leurs dérivés, il est important de connaître leurs compositions exactes notamment en molécules bioactives comme les composés phénoliques, présents en faible concentration. Vu les variations importantes de contenu en composés phénoliques entre espèces végétales, entre lots d'une même espèce et au cours des processus de transformation des denrées alimentaires, il est nécessaire de développer une méthode d'analyse précise et rapide pour les identifier et les quantifier.

La spectroscopie infrarouge présente les avantages d'être rapide, simple d'utilisation et non destructive. Par ailleurs, elle ne nécessite peu ou pas de préparation des échantillons et vu l'utilisation très limitée voire nulle de solvants, elle peut être considérée comme respectueuse de l'environnement. Dans le cadre de ce travail, une méthodologie basée sur la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-MIR) où le spectromètre est équipé d'un accessoire à réflexion totale atténuée (ATR), a été développée pour identifier les composés phénoliques présents dans une matrice végétale. Après avoir caractérisé chaque standard de composés phénoliques (présents sous forme de poudre), les paramètres d'acquisition des spectres et la technique de mesure ont été optimisés pour des solutions à base de standards d'acides phénoliques. La méthode des extraits secs, c'est à dire la mesure du résidu phénolique après évaporation du solvant, a été sélectionnée pour la suite des analyses. Une fois la répétabilité et la reproductibilité confirmées, des tests ont été menés sur des mélanges liquides, à base d'acides phénoliques. Ces analyses ont permis de mettre au point, d'une part, la méthode de préparation et d'analyse de mélanges et, d'autre part, la méthode de caractérisation spectrale des mélanges à partir d'informations sur les standards. Finalement, la technique a été appliquée à un échantillon de pelures de pommes ainsi qu'à l'extrait phénolique obtenu à partir des mêmes pelures de pommes afin de confronter le modèle (représenté par un mélange synthétique) avec la réalité.

L'analyse de l'extrait phénolique de pelures de pommes par un spectromètre FT-MIR muni d'un accessoire ATR, permet d'avoir une première estimation de sa composition en composés phénoliques à savoir l'acide chlorogénique, l'épicatéchine, la quercétine-3-galactoside, la procyanidine B2 et la quercétine-3-arabinoside.

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier le professeur Yvan Larondelle, promoteur de ce mémoire pour ses remarques judicieuses et son aide pour la rédaction.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du Centre wallon de Recherches agronomiques. Plus particulièrement au département valorisation et à Vincent Baeten, directeur du département, pour m'avoir accueillie dans son service et pour ses conseils avisés, à Ouissam Abbas, ma maître de stage, pour son aide, ses idées et le temps qu'elle m'a consacré, et également à Quentin Arnould, technicien du laboratoire de spectroscopie, pour ses nombreux coups de main tout au long de ce travail.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>PARTIE THEORIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE .....</b>	<b>11</b>
1. SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE .....	11
2. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE .....	12
3. INSTRUMENTATION POUR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE .....	13
3.1 SPECTROMETRE .....	13
3.2 REFLEXION TOTALE ATTENUÉE.....	14
4. INTERPRETATION DES SPECTRES .....	16
<b>2. TRAITEMENTS DES DONNEES SPECTRALES .....</b>	<b>19</b>
1. PRETRAITEMENTS.....	19
2. ANALYSE MULTIVARIEE.....	20
3. ANALYSES STATISTIQUES .....	21
3.1 STATISTIQUES SUR LA REPETABILITE .....	21
3.2 STATISTIQUES SUR LA REPRODUCTIBILITE .....	22
<b>3. COMPOSES PHENOLIQUES .....</b>	<b>23</b>
1. CARACTERISTIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES .....	23
1.1 STRUCTURE CHIMIQUE .....	23
1.2 BIOSYNTHESE ET METABOLISME .....	27
2. DETERMINATION DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR SPECTROSCOPIE MOYEN INFRAROUGE .....	28
2.1 EVALUATION DE LA QUALITE DES MATRICES VEGETALES .....	29
2.2 ÉVALUATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE DES MATRICES VEGETALES .....	30
2.3 EVALUATION DU PROFIL EN COMPOSES PHENOLIQUES DES MATRICES VEGETALES.....	32
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>35</b>
<b>1. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
1. DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ANALYSES .....	38
1.1 STANDARDS DE COMPOSES PHENOLIQUES .....	38
1.1.1 Préparation des standards sous forme de poudres .....	38
1.1.2 Mise en solution des standards.....	38
1.2 MELANGES D'ACIDES PHENOLIQUES .....	39
1.2.1 Préparation des mélanges sous forme de poudre .....	40
1.2.2 Mise en solution des mélanges .....	40

1.3 PELURES DE POMMES .....	41
1.3.1 Préparation du mélange synthétique.....	41
1.3.2 Mise en solution des pelures de pommes et leurs extraits phénoliques .....	42
<b>2. ANALYSE DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>43</b>
2.1 STANDARDS DE COMPOSES PHENOLIQUES .....	43
2.1.1 Analyse des standards sous forme de poudre .....	43
2.1.2 Analyse des standards sous forme de solutions.....	43
2.2 MELANGES .....	45
<b>3. TRAITEMENTS DES DONNEES SPECTRALES.....</b>	<b>45</b>
<b><u>2. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b>1. STANDARDS DE COMPOSES PHENOLIQUES.....</b>	<b>47</b>
1.1 ANALYSE DES SPECTRES DE STANDARDS SOUS FORME DE POUDRES.....	47
1.1.1 Discrimination des familles de composés phénoliques.....	49
1.2 ANALYSE DES SPECTRES DE STANDARDS DE COMPOSES PHENOLIQUES EN SOLUTION .....	56
1.2.1 Optimisation au moyen de l'acide gallique .....	56
1.2.2 Répétabilité et reproductibilité des mesures spectrales des standards d'acides phénoliques.....	59
<b>2. MELANGES D'ACIDES PHENOLIQUES .....</b>	<b>63</b>
2.1 CHOIX DE LA TECHNIQUE DE PREPARATION .....	63
2.2 INTERPRETATION SPECTRALE .....	65
<b>3. PELURES DE POMMES.....</b>	<b>67</b>
<b><u>CONCLUSION .....</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
Publications.....	77
Sites internet : citations et figures .....	79
Livres .....	80
Autres.....	80
<b><u>ABREVIATIONS.....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>84</u></b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Spectre électromagnétique .....	11
Figure 2 : Diagramme représentant les niveaux d'énergie possibles par une molécule excitée .....	12
Figure 3 : Illustration des vibration d'une fonction chimique de type méthylène .....	12

Figure 4 : Spectromètre infrarouge (Bruker) à transformée de Fourier, photo (à gauche) et schéma (à droite).....	14
Figure 5 : Techniques spectrométriques de réflexion .....	15
Figure 6 : Schéma d'un accessoire de réflexion totale atténuée.....	15
Figure 7 : Table des combinaison entre les régions du spectre moyen infrarouge et des liaisons chimiques .....	17
Figure 8 : Spectre MIR d'un standard d'acide gallique sous forme de poudre.....	17
Figure 9 : Schéma représentatif des familles de composés phénoliques .....	24
Figure 10 : Structure de base des acides hydroxybenzoïques (à gauche) et hydroxycinnamiques (à droite) .....	24
Figure 11 : Structure de base des stilbènes.....	25
Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes.....	26
Figure 13 : Exemples de tannins hydrolysables (à gauche un gallotannin) et condensés (à droite, la procyanidine B1) .....	27
Figure 14 : Structure de base des lignanes <sup>17</sup> .....	27
Figure 15 : Etapes de préparation des standards, de composés phénoliques purs et en mélanges, et mesures spectrales réalisées .....	37
Figure 16 : Spectres MIR de la lutéoline. Fournisseurs : Sigma Aldrich (bleu), Extrasynthèse (rouge) et Cayman ChemicalCompany (vert). .....	48
Figure 17 : Spectres MIR de l'acide sinapique. Fournisseurs : Sigma Aldrich (bleu) et Extrasynthèse (rouge). .....	48
Figure 18 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur la totalité des spectres MIR, traités par dérivée I, des composés phénoliques.....	49
Figure 19 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des composés phénoliques. Le pyrocatechol a été exclu de ce traitement de données .....	50
Figure 20 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des acides phénoliques et des flavonoïdes .....	50
Figure 21 : Loading de la première composante, en fonction du nombre d'onde, de l'ACP appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des acides phénoliques et des flavonoïdes.....	51
Figure 22 : Résultat de l'ACP (PC1 vs PC2) appliquée sur les spectres MIR, traités par dérivée I, des flavonoïdes .....	52
Figure 23 : Coefficient de variation le long du fingerprint (1800-700 cm <sup>-1</sup> ) : échantillon liquide (rouge) et extraits secs (bleu).....	57

Figure 24 : Spectres MIR de l'extrait sec de l'acide gallique (solution à 1000 ppm) si le volume de solution déposé sur le cristal vaut 100 µl (bleu), 80 µl (rouge) ou 50 µl (vert).....	58
Figure 25 : RMS moyen en fonction de la concentration de la solution d'acide gallique et du nombre de scans.....	58
Figure 26 : RMS moyen des huit standards d'acides phénoliques et de « Medeo » .....	59
Figure 27: Coefficient de variation des huit standards d'acides phénoliques en fonction du nombre d'onde.....	60
Figure 28 : Contribution des standards au mélange.....	64
Figure 29 : Spectre MIR du mélange 1 (acide syringique + acide vanillique). Les numéros correspondent aux région auxquelles sont associées les pics .....	65
Figure 30 : Diagramme en radar des mélanges d'acides phénoliques.....	66
Figure 31 : Spectre MIR du mélange synthétique de pelures de pommes. Les numéros correspondent aux région auxquelles sont associées les pics .....	68
Figure 32 : Diagramme en radar du mélange synthétique, de la poudre de pelures de pommes et de son extrait phénolique. ....	69

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Volumes nécessaires pour réaliser les solutions à base d'acide gallique. ....	39
Tableau 2 : Composition des mélanges d'acides phénoliques analysés.....	40
Tableau 3 : Composition principale en composés phénoliques de pelure de pommes (valeurs de la littérature et mélange synthétique).....	42
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des groupements caractéristiques en spectroscopie MIR associées aux composés phénoliques.....	55
Tableau 5 : p-valeur des ANOVA à un facteur pour la reproductibilité des mesures de différents composés phénoliques en spectroscopie MIR.....	61
Tableau 6 : p-valeur des ANOVA à un facteur sur l'influence des conditions de mesures .....	62
Tableau 7 : Composition des mélanges d'acides phénoliques analysés.....	63
Tableau 8 : Composition principale en composés phénoliques de pelure de pommes (valeurs de la littérature et mélange synthétique).....	67

# INTRODUCTION

Selon l'OMS<sup>1</sup>,

*« Une alimentation saine et la pratique d'une activité physique sont essentielles pour une bonne nutrition et une vie longue et en bonne santé. »*

Une alimentation saine va de pair avec une consommation quotidienne de cinq portions de fruits et légumes (l'OMS recommande de consommer minimum 400g de fruits et légumes par jour pour prévenir l'apparition de maladies chroniques<sup>1</sup>). Les végétaux sont une source privilégiée de minéraux, de fibres et de vitamines mais aussi de molécules bioactives telles que les composés phénoliques (Faller et Fialho 2010).

Les composés phénoliques sont des molécules organiques aux propriétés antioxydantes. Ces dernières permettent entre autre de prévenir l'apparition de certains cancers (Chen *et al.* 2006), de réduire les risques de maladies cardiovasculaires (Lu et Yeap 1999, Shrikhande 2000), et agissent en tant qu'antibactériens, antiviraux et anti-inflammatoires (Mattila et Hellström 2007).

Les composés phénoliques interviennent également dans la qualité sensorielle (astringence, amertume) et nutritionnelle des plantes (Peng *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2009). Dès lors, ils jouent un rôle important dans le secteur de l'agroalimentaire. De plus, ils peuvent se révéler 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 (Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Habituellement, les composés phénoliques sont déterminés par des techniques lourdes et qui nécessitent beaucoup de temps et de solvants. Le développement d'une méthode d'analyse plus rapide, fiable et pertinente, et si possible peu onéreuse, faciliterait l'identification et l'évaluation de la teneur en composés phénoliques dans les matrices végétales (Queji *et al.* 2009).

La spectroscopie moyen infrarouge se présente comme un candidat approprié pour atteindre cet objectif et va donc être mise en situation dans ce travail. Sur base de l'analyse et de l'interprétation spectrale de composés phénoliques simples, nous allons développer une méthode visant à déterminer le profil en composés phénoliques, dans un premier temps dans un mélange de synthèse de composition connue, et dans un second temps dans une matrice végétale complexe.

---

<sup>1</sup> Source : [www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/summary/fr/index.html](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/summary/fr/index.html)



## PARTIE THÉORIQUE

---

*Dans cette partie, nous présenterons les différents outils (**spectroscopie infrarouge** et **chimométrie**) qui ont permis le développement de la méthode spectroscopique que nous avons évaluée pour la détection des **composés phénoliques** dans les matrices végétales.*



# 1. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

## 1. SPECTRE ÉLECTROMAGNÉTIQUE

Le spectre électromagnétique peut être divisé en plusieurs plages spectrales selon la gamme de longueur d'onde considérée (Figure 1).

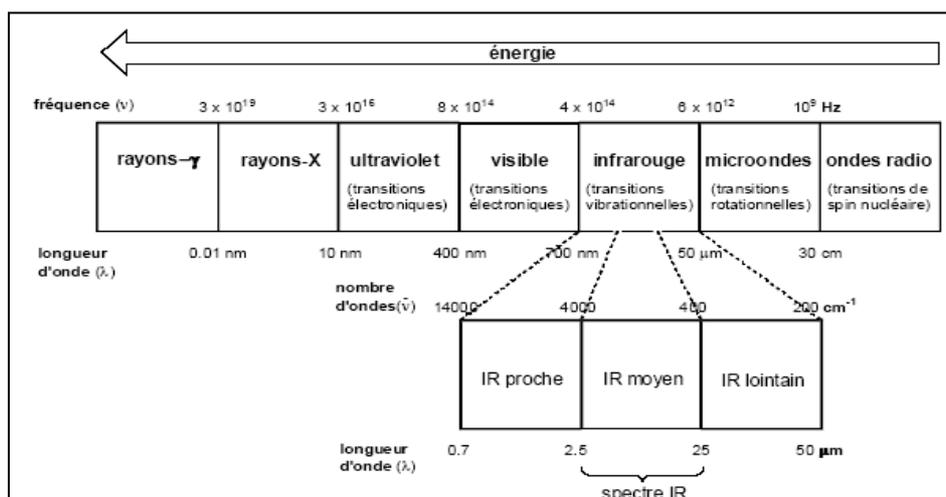


Figure 1: Spectre électromagnétique

L'énergie contenue dans une radiation peut être absorbée par une molécule et lui permet de passer d'un état dit de repos ( $S_0$ ) à un état excité ( $S_i$  avec  $i \geq 1$ ). Selon la quantité d'énergie de la source lumineuse, différents **niveaux d'énergie** peuvent être atteints par la molécule excitée (Figure 2) : les rayons gammas, X, UV et la lumière visible, plus énergétiques, permettront d'atteindre des niveaux électroniques, les infrarouges (IR) seront associés aux transitions d'énergie de type **vibrationnel** (proche et moyen IR) ou rotationnel (rouge lointain), les micro-ondes, moins énergétiques, sont également associés aux transitions rotationnelles tandis que les ondes radios, qui sont les rayons les moins énergétiques, provoquent des transitions de spin nucléaire. A chaque type de rayon correspond une application particulière, directement liée à la quantité d'énergie véhiculée. Par exemple, les UV, riches en énergie, sont utilisés en phosphorescence et luminescence pour la détection de molécules, tandis que l'IR, moins énergétique que les UV, permet le contrôle en ligne de produits agroalimentaires, l'estimation de propriétés physico-chimiques sur base d'équations chimiométriques ainsi que la caractérisation de la composition chimique des échantillons.

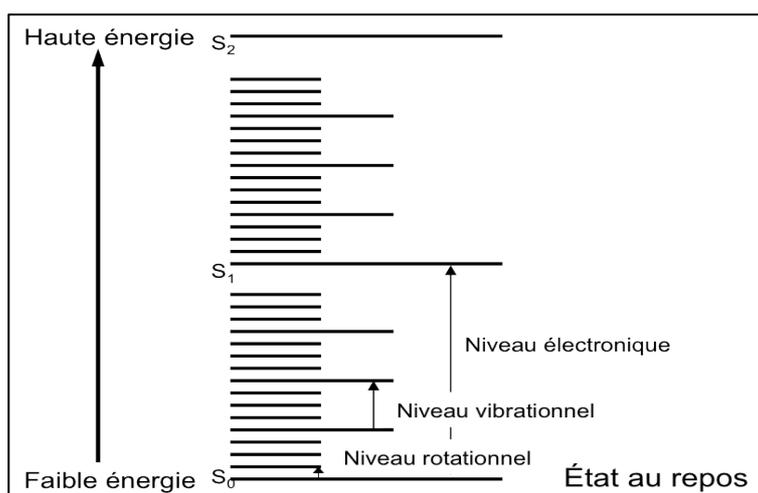


Figure 2 : Diagramme représentant les niveaux d'énergie possibles par une molécule excitée<sup>2</sup>

## 2. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Le rayonnement IR peut être divisé en trois catégories : le proche IR (12500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), le moyen IR (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) et le rouge lointain (400-200  $\text{cm}^{-1}$ ). 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 (Figure 3). Les **élongations** se font le long de l'axe, imaginaire, reliant deux atomes, tandis que les **déformations** se font soit dans le plan, par des mouvements de balancement ou de cisaillement, soit en dehors du plan, par des mouvements de rotation ou de torsion (Bruice 2007). A chaque mode de vibration correspondent une fréquence dite fondamentale et plusieurs fréquences harmoniques. Le moyen infrarouge (MIR) comporte uniquement des fréquences fondamentales.

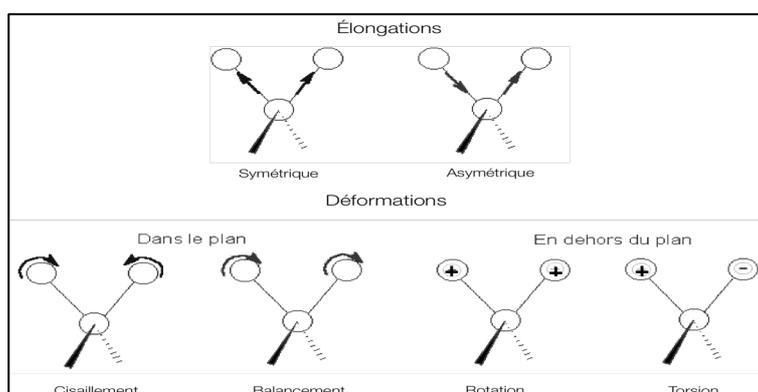


Figure 3 : Illustration des vibrations d'une fonction chimique de type méthylène<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Source : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Molecular\\_energy\\_levels\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Molecular_energy_levels_en.svg)

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

En absorbant l'énergie du faisceau, la molécule entre en vibration et induit une diminution de l'intensité lumineuse du faisceau transmis, il s'agit du **phénomène d'absorption**.

La loi de Lambert-Beer permet de quantifier l'absorption.

$$A_{\lambda} = \log(I_0/I_t) = \epsilon_{\lambda} l C, \quad (1)$$

où  $A_{\lambda}$  représente l'absorption à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $I_0$  l'intensité initiale du rayon IR,  $I_t$  l'intensité transmise,  $\epsilon_{\lambda}$  le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde  $\lambda$  (exprimé en  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ),  $l$  le chemin optique (exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ ) et  $C$  la concentration du composé étudié (exprimé en  $\text{mol.l}^{-1}$ ).

Comme chaque liaison chimique possède sa propre énergie de vibration, il est possible d'associer à chaque liaison une longueur d'onde particulière car l'énergie du faisceau,

$$E = h\nu, \quad (2)$$

où  $E$  représente l'énergie,  $h$  la constante de Planck,  $6,6.10^{-34}$  joules.s<sup>-1</sup>, et  $\nu$  la fréquence en hertz (ou s<sup>-1</sup>),

est inversement proportionnelle à la longueur d'onde puisque

$$\nu = c/\lambda \quad (3)$$

où  $c$ =vitesse de la lumière et  $\lambda$  la longueur d'onde.

### 3. INSTRUMENTATION POUR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Le spectromètre MIR généralement employé est un **spectromètre à transformée de Fourier**. Contrairement à la méthode de type dispersif utilisée au début du XX<sup>ème</sup> siècle, la transformée de Fourier est plus répétable car elle ne nécessite pas de calibration externe du miroir. En effet, la position du miroir est calibrée grâce à un laser interne. Cette méthode est plus rapide, plus simple et offre une meilleure sensibilité.

#### 3.1 SPECTROMÈTRE

Le spectromètre MIR à transformée de Fourier (FT-MIR) est muni d'un interféromètre composé d'une séparatrice et de deux miroirs, l'un fixe et l'autre mobile (Figure 4). Le faisceau lumineux est projeté sur la séparatrice qui sépare ce dernier en deux. Une partie du faisceau est envoyée sur un miroir fixe tandis que l'autre moitié rejoint un miroir mobile. La position du miroir mobile varie au cours du temps de manière à moduler la longueur d'onde du rayon. Les deux

faisceaux sont ensuite renvoyés sur la séparatrice et réfléchis vers l'échantillon. Ils se recombinent en créant des interférences destructives et constructives en fonction de la position du miroir mobile. Ce nouveau faisceau, recombéné, va interagir avec l'échantillon.

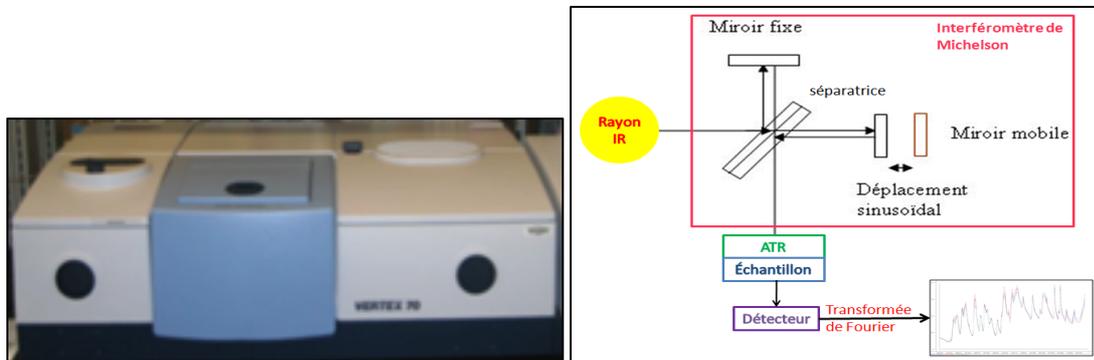


Figure 4 : Spectromètre infrarouge (Bruker) à transformée de Fourier, photo (à gauche) et schéma (à droite)<sup>4</sup>

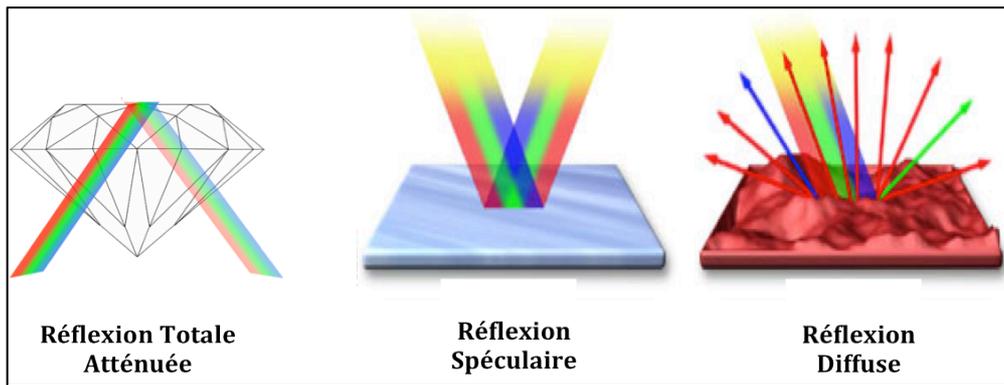
La transformée de Fourier permet de convertir le signal provenant de l'échantillon et exprimé en fonction du temps, en un nouveau signal qui sera fonction de la position du miroir mobile. Le rapport entre ce signal et le signal initial, acquis par le background, fournit un spectre représentant l'absorbance pour la gamme de nombres d'onde sélectionnée.

Le spectre obtenu en MIR sera par convention, exprimé en nombre d'onde, plutôt qu'en longueur d'onde. Notons que le nombre d'onde est l'inverse de la longueur d'onde et a pour unité le  $\text{cm}^{-1}$  et pour symbole  $\nu$ .

### 3.2 RÉFLEXION TOTALE ATTÉNUÉE

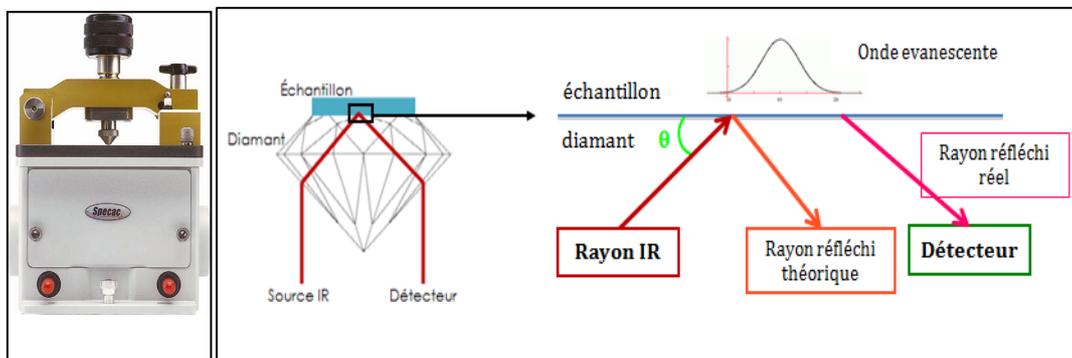
Il existe deux modes de mesure par spectroscopie MIR : la **transmission** et la **réflexion**. La transmission va permettre de comparer l'énergie capable de passer à travers l'échantillon avec l'énergie émise par la source. Il s'agit de la méthode de référence utilisée pour les analyses quantitatives mais elle nécessite une préparation d'échantillons plus longue car il faut mettre les échantillons dans des cellules spéciales avant de mener l'analyse. La réflexion va mesurer la quantité d'énergie renvoyée depuis l'échantillon vers le détecteur. Elle convient pour l'analyse qualitative et semi-quantitative. Parmi les techniques de réflexion, il est possible de distinguer la réflexion totale atténuée (ATR), la réflexion spéculaire et la réflexion diffuse (DRIFT) (Figure 5).

<sup>4</sup> Source : <http://www.lachimie.fr/analytique/infrarouge/interferometre.php>

Figure 5 : Techniques spectrométriques de réflexion<sup>5</sup>

La **réflexion spéculaire** est une réflexion ayant lieu sur les surfaces lisses, où les rayons sont réfléchis avec un angle défini et constant. En revanche, la **DRIFT** se produit sur les surfaces rugueuses qui ont tendance à renvoyer la lumière dans des directions différentes. Dans un accessoire ATR, la lumière traverse un prisme avec un angle excédant l'angle critique de réflexion interne.

L'**ATR** est une technique qui se base sur un contact étroit entre l'échantillon et un cristal à haut indice de réfraction, dans notre cas un diamant (Figure 6). Elle présente l'avantage de pouvoir analyser des échantillons aussi bien sous forme liquide, pateuse ou solide. L'analyse est rapide et ne nécessite pas de traitements d'échantillons avant la mesure spectrale.

Figure 6 : Schéma d'un accessoire de réflexion totale atténuée<sup>6</sup>

<sup>5</sup> Source : <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/reflection/specular/index.html>

<sup>6</sup> Source : (diamant) <http://scrapcoloring.fr/news/diamant>; (gaussienne) <http://olivier.hammam.free.fr/imports/penombre/lg7/lg07c.htm>

Le rayon IR subit une réflexion totale à l'interface diamant-échantillon car l'indice de réfraction du diamant est supérieur à celui de l'échantillon. Le rapport des indices de réfraction définit l'angle critique. Si le faisceau de lumière arrive avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique, il sera totalement réfléchi. Cette réflexion est dite atténuée suite à la formation d'une onde évanescente, résultant de la pénétration sur quelque micromètre du rayonnement dans l'échantillon. La profondeur (dp) est inversement proportionnelle au nombre d'onde ( $\nu$ ), aux indices de réfraction des milieux ainsi qu'à l'angle d'incidence du faisceau lumineux.

$$dp = \frac{1}{2\pi n_1 \nu \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (4)$$

où  $n_1$  et  $n_2$  sont respectivement les indices de réfraction du diamant et de l'échantillon, alors que  $\theta$  est l'angle d'incidence du faisceau.

#### 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 : l'une caractérise les **vibrations d'élongation** alors que l'autre définit les **vibrations de déformations** et est appelée « **Fingerprint** » (Bruice 2007). La Figure 7 est une synthèse concernant la localisation des bandes d'absorption de fonctions chimiques dans la région du MIR.

Frequency, cm <sup>-1</sup>		Group Vibration	Intensity <sup>#</sup>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub>	Lipids
		Skeletal mode			Starch

Figure 7 : Table des combinaison entre les régions du spectre moyen infrarouge et des liaisons chimiques<sup>7</sup>

La région de 1800 à 700 cm<sup>-1</sup>, contient l'essentiel de l'information relative aux composés phénoliques. En effet, au dessus de 1800 cm<sup>-1</sup>, les spectres présentent des bandes larges dues à la présence des fonctions hydroxyles des composés phénoliques. Tandis qu'en dessous de 700 cm<sup>-1</sup>, il y a peu d'informations exploitables (Figure 8). En conséquence, la région de 1800 à 700 cm<sup>-1</sup> sera extraite pour l'analyse et la caractérisation des composés phénoliques ; nous l'appellerons « fingerprint ».

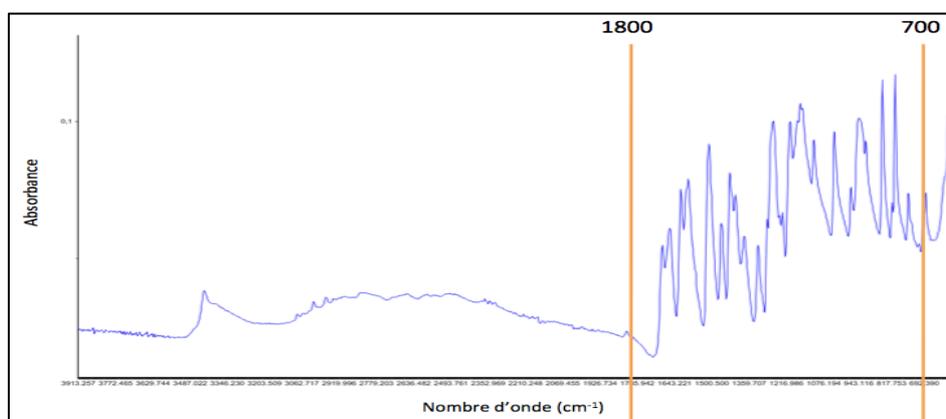


Figure 8 : Spectre MIR d'un standard d'acide gallique sous forme de poudre

<sup>7</sup> Source : Naumann et al. 1991, Pistorius 1995, Piot et al. 2000



## 2. TRAITEMENTS DES DONNÉES SPECTRALES

La spectrométrie est une technique qui fournit un nombre important de données. Afin d'extraire rapidement l'information pertinente que ces dernières contiennent, des traitements chimiométriques sont appliqués aux spectres. La chimiométrie « désigne l'ensemble des outils mathématiques, statistiques et autres méthodes basées sur la logique appliqués à la chimie et en particulier à la chimie analytique »<sup>8</sup> pour améliorer la compréhension des informations obtenues. Les méthodes chimiométriques sont classées selon deux critères : (1) modèle non linéaire ou modèle linéaire et (2) analyse non supervisée ou analyse supervisée. Le modèle linéaire exprime le résultat comme une combinaison linéaire de différentes variables, souvent représenté dans un espace vectoriel. L'analyse non supervisée se base sur un ensemble de données récoltées préalablement contrairement à l'analyse supervisée qui est associée à des courbes d'étalonnage (CSIM 2012). Afin d'extraire l'information contenue dans un spectre, il est souvent nécessaire d'appliquer un prétraitement mathématique. Ensuite une analyse multivariée sera appliquée. Celle-ci permet d'atteindre deux objectifs : (1) visualiser l'information disponible dans des ensembles de données multivariées (exemple : l'analyse en composantes principales) et (2) modéliser le système pour relier l'information spectrale à des valeurs physico-chimiques caractérisant l'échantillon en fonction des autres variables (exemple : la méthode des moindres carrés partiels et la régression en composantes principales).

Les méthodes présentées ci-dessous sont celles qui ont été utilisées pour réaliser les analyses de données spectrales.

### 1. PRÉTRAITEMENTS

Les **dérivées** sont appliquées pour corriger les effets de base dans les spectres dans le but d'éliminer les effets non chimiques et créer des modèles d'étalonnage robustes. En effet, la dérivée première d'un spectre est une simple mesure de la pente de la courbe spectrale en chaque point. Elle ne tient donc pas compte des variations d'intensité présentes entre deux spectres d'un même échantillon. La dérivée première est une méthode très efficace pour éliminer les décalages de la ligne de base. Elle peut aussi séparer des bandes qui se chevauchent. La méthode de Savitzky-Golay utilise une fonction de convolution

---

<sup>8</sup> Govaerts B 2011, *Chimiométrie*

et se base sur des segments adjacents du spectre pour calculer la dérivée en un nombre d'onde particulier plutôt que la différence entre les points de données adjacents. Cela permet de diminuer plus efficacement le bruit (The Unscrambler® X).

La **déviatiion normale standardisée** (SNV-Standard Normal Variate) est une normalisation appliquée à des données spectroscopiques pour éliminer les effets de dispersion par centrage et mise à l'échelle de chaque spectre individuel (à savoir une normalisation axée sur l'échantillon). À chaque nombre d'onde  $k$ , la valeur  $x_k$  d'une rangée de données  $X$  est transformée selon la formule de l'équation 5 (The Unscrambler® X). La SNV présente l'avantage de traiter chaque spectre indépendamment des autres.

$$\widehat{x}_k = \frac{x_k - \bar{X}}{\sigma} \quad (5)$$

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

## 2. ANALYSE MULTIVARIÉE

L'analyse en composantes principales (**ACP**) est une analyse qualitative, linéaire, non supervisée. Son but est de permettre la visualisation des informations contenues dans les données en les projetant dans un espace de dimensions réduites. De plus, elle permet de mettre en évidence les relations entre les variables et d'étudier les liens entre ces dernières. Pour ce faire, un sous-ensemble de  $q$  variables, inférieur au nombre de variables initiales, est créé. Ce sous ensemble contient l'information essentielle des données de départ<sup>9</sup>. Ces nouvelles variables sont des combinaisons linéaires des variables initiales. En général, l'ACP est représentée dans un espace à deux dimensions dont les axes représentent deux des nouvelles variables. Il est ainsi possible de représenter graphiquement l'ACP selon chacune des nouvelles variables.

Si l'objectif est de comparer entre eux plusieurs échantillons, il est important de réaliser un prétraitement avant d'appliquer une ACP afin de réduire les différences entre les données représentatives d'un même échantillon (Naes *et al.* 2002, CSIM 2012).

---

<sup>9</sup> Govaerts B 2011, *Chimométrie*

### 3. ANALYSES STATISTIQUES

#### 3.1 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...)* »<sup>10</sup>. 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 peut être évaluée de plusieurs manières. Nous avons choisi de l'évaluer d'une part en se basant sur la moyenne quadratique et d'autre part sur la base du coefficient de variation.

Dans le cas de mesures spectrométriques, il n'est pas intéressant de calculer la moyenne arithmétique puisque celle-ci reflète une valeur unique d'absorbance atteinte si l'absorbance ne variait pas selon le nombre d'onde. Or, le principe même de la spectroscopie IR est d'étudier les variations d'intensité du spectre.

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 6).

$$\text{RMS}_j = \sqrt{\frac{\sum_i (\bar{X}_j - X_{ij})^2}{n}} \quad (6)$$

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 7, 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.

$$\text{CV}_i = \frac{\sigma_i}{\bar{X}_i} \times 100 \text{ [%]} \quad (7)$$

où pour un nombre d'onde  $i$ ,  $\text{CV}_i$  représente le coefficient de variation,  $\sigma_i$  la variance et  $\bar{X}_i$  la moyenne.

---

<sup>10</sup> Govaerts B 2011, Chimie

### 3.2 STATISTIQUES SUR LA REPRODUCTIBILITÉ

La **reproductibilité** s'évalue au moyen de « *mesures successives d'un même objet effectuées en faisant varier certaines conditions de mesure bien spécifiées* »<sup>11</sup>. Elle permet de contrôler la stabilité des mesures dans le temps, entre différents expérimentateurs, à partir d'appareils différents, etc. Pour étudier la reproductibilité, nous utiliserons le test statistique de l'analyse de la variance (**ANOVA**-Analysis Of Variance) car il permet de comparer la répartition de plusieurs échantillons, selon un ou plusieurs facteurs qualitatifs, parmi une population. Ce test permettra d'évaluer la reproductibilité en comparant les données récoltées sur des échantillons préparés et mesurés à trois périodes distinctes.

Deux hypothèses sont nécessaires pour réaliser une ANOVA : l'hypothèse de normalité – tous les échantillons suivent une loi normale – et l'hypothèse d'indépendance – chaque échantillon est indépendant des autres. L'ANOVA va permettre de tester une hypothèse de départ, appelée  $H_0$ , qui considère que tous les échantillons ont la même moyenne. Cette hypothèse s'oppose à l'hypothèse alternative, nommée  $H_1$ , qui expose qu'au moins un échantillon possède une moyenne différente des autres. La p-valeur, obtenue par le test ANOVA, est la valeur de référence qui permet de conclure sur le rejet ou le non rejet de l'hypothèse  $H_0$ . Pour cela, elle est comparée à un seuil de rejet (ou seuil de risque) appelé  $\alpha$ . Lorsque la p-valeur est inférieure à  $\alpha$ , l'hypothèse de départ est rejetée ; tandis que lorsqu'elle est supérieure à  $\alpha$ ,  $H_0$  est considéré comme non rejetée et donc les groupes ont des moyennes semblables.

Lorsqu'un seul critère, par exemple le temps, est testé il s'agit d'une ANOVA à un facteur. Mais il est également possible de réaliser une ANOVA sur deux (ANOVA à deux facteurs) ou plusieurs paramètres (ANOVA multifactorielle).

---

<sup>11</sup> Govaerts B 2011, *Chimométrie*

### 3. COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Cette partie a été rédigée sur base du livre de Sarni-Manchado et Cheynier : *Les polyphénols en agroalimentaire*, 2006 (ed. Tec&Doc).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires produits par les végétaux généralement sous l'effet du stress, comme par exemple des conditions climatiques particulières ou l'attaque de pathogènes (Faller et Fialho 2010). Leur répartition, quantitative et qualitative, est inégale au sein de la plante et dépend également du stade physiologique ainsi que de l'espèce et de sa génétique.

Les composés phénoliques jouent un rôle important 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. Ils interviennent également 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). De plus, même si les composés phénoliques sont trop lourds pour être considérés comme des arômes, leur catabolisme permet la libération de molécules aromatiques, comme par exemple, l'acide vinyl-4-gaiacol, typique de la bière et issu du catabolisme de l'acide férulique<sup>12</sup>.

#### 1. CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

##### 1.1 STRUCTURE CHIMIQUE

Les composés phénoliques forment un groupe très hétérogène. Leur structure chimique se compose d'au minimum un noyau benzénique sur lequel est fixé un ou plusieurs groupements hydroxyles. D'autres groupements tels que des éthers ou des acides carboxyliques peuvent également y être reliés.

En fonction de leur configuration chimique, les composés phénoliques sont regroupés en différentes familles (Figure 9) : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins et les lignanes.

---

<sup>12</sup> Collin S., 2010, *Chimie des denrées alimentaires*

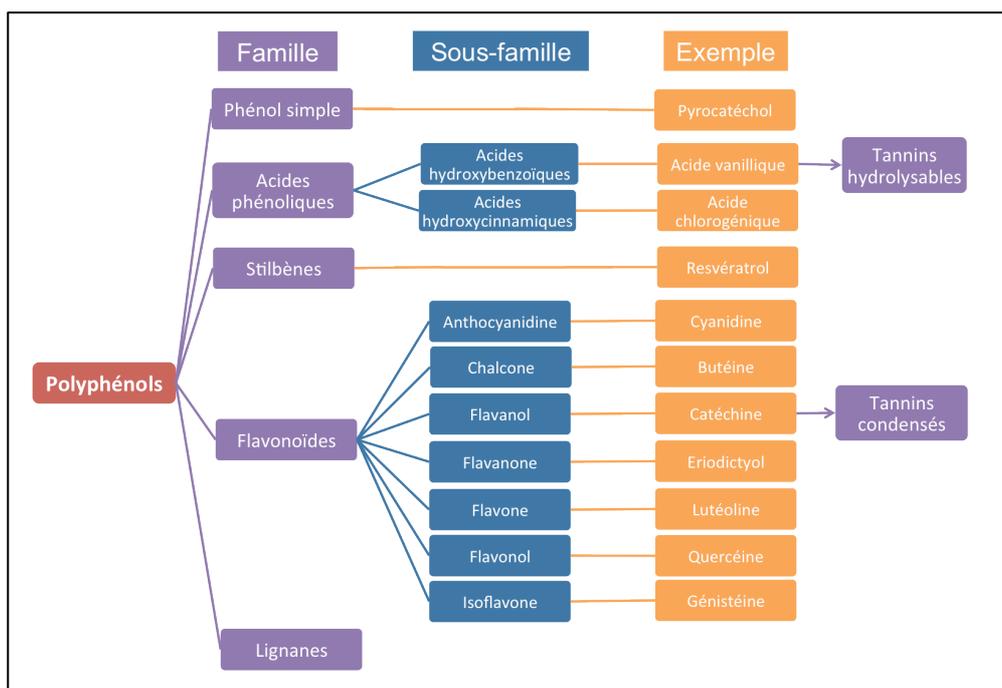


Figure 9 : Schéma représentatif des familles de composés phénoliques<sup>13</sup>

La famille des **acides phénoliques** reprend les molécules composées d'un noyau benzène, d'un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle(s) et d'un acide carboxylique (Figure 10). Ce sont des molécules chimiquement « simples » mais présentes généralement sous forme d'esters ou de glucosides dans les matrices végétales. Elles représentent, en moyenne, un tiers de la consommation totale en composés phénoliques d'une personne (Ignat *et al.* 2011).

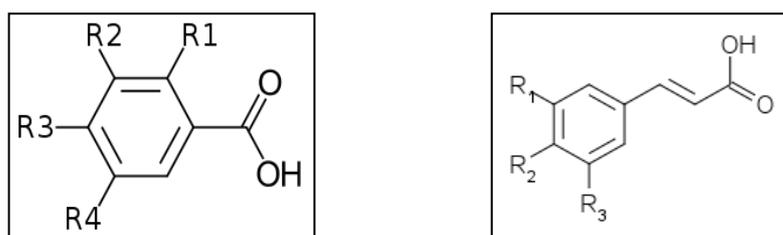


Figure 10 : Structure de base des acides hydroxybenzoïques (à gauche) et hydroxycinnamiques (à droite)<sup>14</sup>

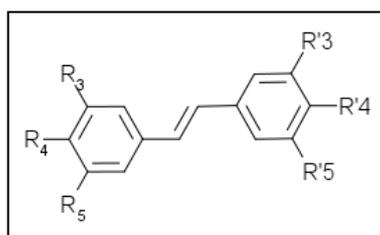
Les substituents  $R_1$  à  $R_4$  varient d'un composé à l'autre et peuvent représenter un hydrogène ou un groupement chimique (hydroxyle, méthoxy, etc)

<sup>13</sup> Source : Sarni-Manchado et Cheynier 2006, Ignat *et al.* 2011

<sup>14</sup> Source des illustrations : Wikipedia

Les acides chlorogénique, caféique et férulique sont les acides phénoliques (hydroxycinnamiques) les plus abondants dans les fruits (acide chlorogénique et caféique) et dans les céréales (acide férulique).

La famille des **stilbènes** comprend les molécules composées de deux noyaux benzéniques liés par un pont alcène (Figure 11). Ils sont peu présents dans notre régime alimentaire habituel. Le plus connu d'entre-eux est le resvératrol, une phytoalexine\* présente dans le vin et reconnue pour son action bénéfique sur les maladies cardiovasculaires.



**Figure 11 : Structure de base des stilbènes<sup>15</sup>**

*Les substituants R<sub>3</sub> à R<sub>5</sub> varient d'un composé à l'autre et peuvent représenter un hydrogène ou un groupement chimique (hydroxyle, méthoxy, etc)*

Les **flavonoïdes** possèdent la structure du diphenylpropane (Figure 12). Celle-ci comprend deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un pont de trois carbones en forme d'hétérocycle (C) (Ignat *et al.* 2011). Les flavonoïdes représentent la moitié de notre consommation en composés phénoliques. Ils sont de bons antioxydants grâce à leur potentiel rédox fort qui leur permet d'agir contre les composés oxydants, les donneurs d'hydrogène et les radicaux libres. De plus, ils possèdent un potentiel en tant que chélateurs de métaux (Tsao et Yang 2003).

Les flavonoïdes sont divisés en sept sous-classes : les anthocyanidines, les chalcones, les flavanols, les flavanones, les flavones, les flavonols et les isoflavones. Ces sous-classes diffèrent entre-elles par le degré d'oxydation du cycle B ainsi que par sa structure. Au sein d'un même groupe, les variations porteront sur le degré d'oxydation des deux autres cycles, sur le niveau de méthylation et sur le niveau de glycosylation. Les formes glycosylées sont très fréquentes dans les végétaux. Les sucres sont liés à la partie phénolique grâce à une liaison glycosidique dont la position dépend du type de groupe.

<sup>15</sup> Source des illustrations : Wikipedia

\* définition en Annexe IX

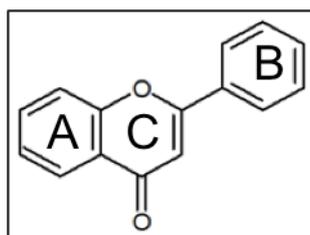


Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes<sup>16</sup>

La sous-classe des **flavanones** est caractérisée par la présence d'un cycle C saturé. Les **isoflavones** présentent des similarités avec les molécules d'œstradiol, ce qui leur vaut d'être parfois nommés phyto-œstrogènes. Pour leur part, les **anthocyanidines** sont assez connues pour leurs effets colorants. Les dérivés glycosylés des anthocyanidines, les anthocyanines ou anthocyanes, sont des pigments hydrosolubles, très courants, responsables par exemple de la couleur rouge des feuilles des arbres, des fruits et des fleurs. Les anthocyanines présentent un fort pouvoir antioxydant, car elles réagissent très rapidement avec les formes oxydées, et possèdent des propriétés biologiques telles que des effets anti-inflammatoires (Ignat *et al.* 2011).

Les **tannins** sont partagés entre les tannins hydrolysables, dérivés d'acides hydroxybenzoïques, et les tannins condensés dérivés de flavanols (Figure 13). Les tannins sont capables de précipiter les protéines et provoquent l'astringence des fruits et des légumes.

Les **tannins hydrolysables** sont des esters d'acide gallique ou d'acide ellagique associés à un polyol (fréquemment un glucose). Ils sont sensibles aux dégradations chimiques et enzymatiques et se retrouvent abondamment dans le bois.

Les **tannins condensés**, ou pro-anthocyanines, sont des polymères de catéchines et de ses isomères, parfois de flavane-3,4-diol. Ils sont résistants aux hydrolyses mais une attaque chimique forte peut altérer la molécule et libérer des dimères « colorés » (d'où le nom de pro-anthocyanine). Contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés sont présents principalement dans les fruits et dans les boissons qui sont dérivées de végétaux (vin, thé, etc.). Les dimères sont dénommée A ou B en fonction de leur configuration. Le groupe B rassemble les molécules composées de deux flavanols reliés par une liaison C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>. Le groupe A possède la particularité de former une liaison éther C<sub>5</sub>-C<sub>2</sub> ou C<sub>7</sub>-C<sub>2</sub> supplémentaire.

<sup>16</sup> Source des illustrations : Wikipedia

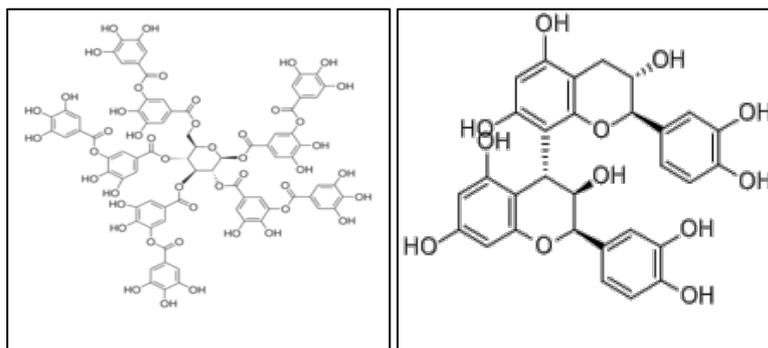


Figure 13 : Exemples de tannins hydrolysables (à gauche un gallotannin) et condensés (à droite, la procyanidine B1)<sup>17</sup>

Contrairement aux autres composés phénoliques, les **lignanes** sont principalement présentes dans les végétaux sous forme libre. Elles sont composées de deux fragments phénylpropanoïdes, appelées monolignols (Figure 14). Certaines lignanes sont considérées comme étant des phytoœstrogènes et semblent donc impliquées dans la prévention de cancers hormono-dépendants (Diel *et al.* 1999).

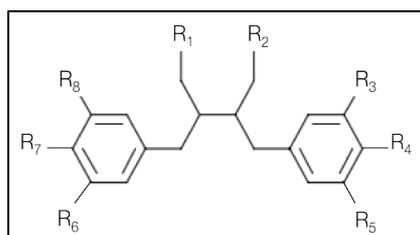


Figure 14 : Structure de base des lignanes<sup>17</sup>

Les substituants  $R_1$  à  $R_8$  varient d'un composé à l'autre et peuvent représenter un hydrogène ou un groupement chimique (hydroxyle, méthoxy, etc)

## 1.2 BIOSYNTHESE ET METABOLISME

Dans les plantes, les composés phénoliques sont synthétisées selon un processus complexe faisant intervenir cinq voies métaboliques différentes (*Annexe III*) : (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 (Cheynier *et al.* 2012).

<sup>17</sup> Source des illustrations : Wikipedia

La majorité des composés phénoliques sont dérivés de l'acide aminé phénylalanine (de la voie de l'acide shikimique). La désamination de la phénylalanine (voie des phénylpropanoïdes) donne naissance à l'acide cinnamique, précurseur des acides hydroxycinnamiques simples.

Les autres familles vont être synthétisées à partir des acides hydroxycinnamiques (*Annexe III*). Une  $\beta$ -oxydation permet d'obtenir la classe des acides hydroxybenzoïques ; une cyclisation mène aux coumarines tandis que les flavonoïdes et les stilbènes résultent de la condensation chimique de trois molécules d'acétyl coenzyme A avec une molécule de p-coumaroyl-CoA.

Plusieurs transformations (hydroxylation, oxydation, réduction, etc.) ont ensuite lieu au sein de ces familles pour obtenir la diversité de structure connue actuellement.

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).

## 2. DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PAR SPECTROSCOPIE MOYEN INFRAROUGE

Habituellement, la qualité et les propriétés nutritionnelles des aliments ainsi que la teneur en composés phénoliques des végétaux sont déterminées par les méthodes dites conventionnelles. Parmi celles-ci, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est sans doute la plus répandue. Elle fournit de bons résultats quelle que soit la matrice végétale étudiée (Mattila et Hellström 2007, Khanizadeh *et al.* 2008, Raal *et al.* 2012). La chromatographie liquide à ultra performance (UPLC), les méthodes colorimétriques ou encore l'électrophorèse sont aussi fréquemment appliquées (Peng *et al.* 2005, Ceymann *et al.* 2012). Toutefois, ces techniques sont longues, onéreuses et nécessitent, pour la plupart, beaucoup de solvants.

Le développement d'une méthode d'analyse rapide et précise, et si possible peu onéreuse, faciliterait l'évaluation de la teneur en composés phénoliques dans les matrices végétales. Les composés phénoliques interviennent dans la qualité, il est donc important de les identifier et de les quantifier. La spectroscopie MIR étant utilisée pour la caractérisation de molécules, elle pourrait permettre l'évaluation de la qualité de matrices alimentaires grâce à la détermination de sa composition. Plusieurs équipes de chercheurs se sont

tournées vers elle pour évaluer la qualité des matrices végétales et pour quantifier et identifier les composés phénoliques (Kemsley *et al.* 1996, Schulz et Banranska 2007, Soriano *et al.* 2007, Bauer *et al.* 2008).

Dans cette section, nous allons présenter la spectroscopie MIR comme outil fiable pour déterminer la qualité. Nous présenterons ensuite quelques travaux qui portent sur des applications plus spécifiques de la spectroscopie MIR telles que l'évaluation de la capacité antioxydante et de la teneur totale en composés phénoliques ou l'identification du profil en composés phénoliques de certaines matrices. Certains chercheurs ont déjà évalué le potentiel de la spectroscopie MIR dans ce contexte.

### 2.1 EVALUATION DE LA QUALITÉ DES MATRICES VÉGÉTALES

La spectroscopie FT-MIR est de plus en plus appliquée à l'évaluation de la qualité de produits agroalimentaires. Les propriétés et les caractéristiques d'un végétal peuvent notamment être déterminées grâce à la spectroscopie FT-MIR. Sinelli *et al.* (2008) ont étudié la qualité et les propriétés nutraceutiques de deux variétés de myrtilles collectées en 2005 et 2006. Les mesures ont été prises en proche et en moyen IR par un spectromètre à FT-IR muni d'un accessoire ATR horizontal. Les données, corrigées par une dérivée première et seconde, ont ensuite été traitées par une régression des moindres carrés partiels (PLS\*) où les spectres MIR ont été reliés aux paramètres technologiques et aux valeurs nutraceutiques. Le modèle a été validé de façon interne et testé sur des échantillons externes à la base de données déjà utilisées. Une bonne performance du modèle a été révélée pour la prédiction du taux total des solides solubles (RMSECV = 0,30%, RMSEP = 0,36%), de même que pour les paramètres qui interviennent dans la détermination des propriétés nutraceutiques.

Les deux études suivantes montrent le potentiel de la spectroscopie FT-MIR pour la discrimination d'espèces et de cultivars.

Le potentiel de la micro-spectroscopie FT-MIR (c'est à dire la combinaison d'un spectromètre MIR et d'un microscope) et de la DRIFT ont été évalués, par Belton *et al.* (1995), pour la discrimination de dix échantillons de fruits et légumes vis à vis d'un échantillon de référence, la pomme. Dans le cas de la DRIFT, les extraits végétaux ont été mélangés à du KBr pour réduire les effets de réflexions spéculaires, et les données ont été traitées par des ACP et analyses discriminantes. Par contre la discrimination des extraits végétaux par micro-spectroscopie IR se fait visuellement. Les deux méthodes ne donnent pas des résultats strictement identiques, mais elles parviennent toutes deux à distinguer les parois des fruits et des légumes par rapport à celles des pommes. Belton et son équipe proposent donc de choisir la méthode qui convient le mieux selon le nombre d'échantillons disponibles : la micro-spectroscopie possède une

meilleure résolution et ne nécessite pas de préparation d'échantillons, mais elle est plus laborieuse que la DRIFT, qui demande une plus longue préparation d'échantillons mais qui convient mieux à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

Une autre étude intéressante porte sur la discrimination de cultivars de vigne dans le vin rouge autrichien (Edelmann *et al.* 2001). Les échantillons de vin ainsi que leurs extraits phénoliques ont été analysés par spectroscopie FT-MIR couplé à un accessoire ATR. Les spectres mesurés reflétaient la composition en composés phénoliques du raisin et permettaient donc de déterminer la variété de raisin présente dans le vin ainsi que son degré de maturité. Les données normalisées et dérivées ont ensuite été traitées par des traitements chimiométriques de classification selon les cultivars. La région spectrale incluse entre 1680 et 900  $\text{cm}^{-1}$  a été sélectionnée pour réaliser les tests de classification. Vu la complexité des échantillons bruts de vin et leur contenance en sucre et en acides organiques, la préparation d'extraits riches en composés phénoliques a été nécessaire pour obtenir une classification suffisamment nette. L'utilisation du logiciel « Soft independent modelling by class analogy » (SIMCA\*) a finalement permis la discrimination des cultivars étudiés.

## 2.2 ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DES MATRICES VÉGÉTALES

Le pouvoir antioxydant d'une matrice alimentaire est souvent corrélé avec sa teneur en composés phénoliques. L'évaluation de la capacité antioxydante totale (TAC) fournit donc souvent des informations sur la teneur en composés phénoliques dans les matrices végétales.

Une **molécule antioxydante** est une molécule qui va interagir avec un agent oxydant pour prévenir la formation de radicaux libres. Il existe cinq modes d'intervention possibles : l'interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires, la chélation de métaux de transition, la désactivation des espèces oxygénées réactives, l'inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation ou l'abaissement de la pression partielle en oxygène. Les composés phénoliques n'interagissent pas tous de la même manière avec un oxydant. Chaque composé peut posséder sa propre stratégie.

Il existe plusieurs **méthodes de référence** pour évaluer la capacité antioxydante d'un aliment ou d'une boisson. Le test du 2,2-DiPhenyl-PicrylHydrazyl (DPPH\*), le test Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC\*) et le test Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP\*) sont fréquemment rencontrés dans la littérature (Paixão *et al.* 2007, Lu *et al.* 2011, Ceymann *et al.* 2012).

Parallèlement à la mesure de la capacité antioxydante, la composition totale en composés phénoliques est également mesurée car ces deux paramètres sont corrélés positivement (Pazourek *et al.* 2005, Paixão *et al.* 2007, Khanizadeh *et al.* 2008, Versari *et al.* 2009). La méthode **Folin-Ciocalteu** (F-C\*) est régulièrement utilisée pour déterminer le contenu total en composés phénoliques.

Bien qu'elles soient très utilisées, ces méthodes présentent plusieurs désavantages : par exemple la méthode F-C est peu sélective, peu spécifique et ne tient pas compte des mécanismes d'oxydation et d'interférence (Siger *et al.* 2012) - c'est pourquoi, il arrive par exemple que la somme des composés phénoliques identifiés dans une matrice soit supérieure au résultat obtenu par la méthode F-C. De plus, ces méthodes sont souvent longues à mettre en œuvre.

La spectroscopie FT-MIR, couplée à une analyse chimiométrique, a déjà fait ses preuves pour évaluer la capacité antioxydante et la composition totale en composés phénoliques de matrices végétales (Queji *et al.* 2010, Versari *et al.* 2010). En voici quelques exemples.

Queji *et al.* (2010) ont mené une étude visant à développer une méthode permettant de quantifier les sucres simples, l'acide malique et les composés phénoliques contenus dans du marc de pomme. En effet, le marc de pomme est un substrat intéressant pour les biotechnologies. Cependant, il est important de connaître sa composition avec précision pour mieux le valoriser. La spectroscopie DRIFT, couplée à une régression PLS, a permis d'obtenir des modèles de prédiction de la concentration totale en composés phénoliques avec des coefficients de corrélation égale à 0,95 et 0,93, respectivement pour la calibration et la validation. L'inconvénient de la spectroscopie DRIFT est qu'elle ne peut être utilisée que sur des types bien particuliers d'échantillon (échantillons solides).

L'équipe de Versari (2010) s'est intéressée à la détermination de la TAC du vin rouge grâce à la spectroscopie FT-MIR munie d'un accessoire ATR horizontal. La régression PLS a montré une bonne corrélation, égale à 0,85, entre les résultats de la méthode spectroscopique et ceux des méthodes de référence utilisées. De plus, l'erreur de prédiction est située dans le même ordre de grandeur que l'incertitude des méthodes de référence (RMSECV = 4,7). Ces résultats peuvent être considérés comme prometteurs mais un plus grand nombre d'échantillons est nécessaire afin de valider le protocole.

Le même type de spectroscopie (FT-MIR munie d'un accessoire ATR horizontal) a été appliqué pour la détermination du contenu phénolique et de la TAC des oignons et des échalotes (Lu *et al.* 2011). Les données spectrales d'un ensemble d'échantillons d'oignons et d'échalotes de variétés et d'origines géographiques différentes ont été traitées par régression PLS. Les analyses ont révélé que la spectroscopie FT-MIR permettait d'évaluer la capacité antioxydante des oignons et des échalotes avec une précision similaire à celle

des méthodes traditionnelles citées au début de cette section. Un coefficient de corrélation supérieur à 0,95 a été obtenu entre les valeurs prédites par FT-MIR et les valeurs de référence pour la capacité antioxydante et le contenu phénolique.

### 2.3 ÉVALUATION DU PROFIL EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES MATRICES VÉGÉTALES

Nous avons vu que la spectroscopie MIR permettait de mesurer certaines propriétés des végétaux et qu'elle permettait de connaître la composition totale en composés phénoliques. Certaines études ont tenté d'aller plus loin et d'identifier les familles des composés particuliers ou même des composés particuliers.

La teneur en anthocyanines dans les cerises a pu être déterminée en utilisant la spectroscopie DRIFT. Le but était de développer une méthode permettant d'évaluer la maturité des fruits (Pappas *et al.* 2009). La couleur de la cerise est influencée par son degré de maturité. Or elle dépend directement de la teneur en anthocyanines. La quantification des anthocyanines permet donc d'évaluer le degré de maturité des fruits. Les spectres obtenus en spectroscopie DRIFT ont été traités par une analyse de déconvolution en utilisant la méthode « *curve-fitting\** ». Une relation linéaire entre le contenu en anthocyanines et l'aire de la bande incluse entre 1640 et 1630  $\text{cm}^{-1}$  a été établie tout en obtenant un coefficient de corrélation égal à 0,99. La technique DRIFT a montré des résultats équivalents à ceux de la méthode de référence (ici la spectroscopie UV-vis) en termes de reproductibilité et de précision.

Manthey (2006) s'est intéressé à l'élaboration d'une méthode pour évaluer la teneur en flavones polyméthoxylés (PMF) dans des résidus de l'huile d'orange. Les échantillons ont été déposés sous forme de fin film sur une carte PTFE, puis mesurés en utilisant un spectromètre FT-MIR. L'interprétation spectrale des PMF dans plusieurs extraits d'huile a révélé que l'intensité du pic situé aux alentours de 1515  $\text{cm}^{-1}$  était proportionnelle à la concentration en PMF avec un coefficient de corrélation égal à 0,98. Cette technique ne fournit pas d'informations sur les composés appartenant à la famille des PMF mais elle permet une détection rapide de la teneur en PMF total.

Dans les deux exemples présentés ci-dessous, la spectroscopie IR a permis la caractérisation d'un groupe de composés phénoliques au moyen d'une région particulière sur le spectre électromagnétique. Pour terminer, voici une étude sur l'application de la spectroscopie FT-MIR à l'analyse qualitative et quantitative d'un acide phénolique au sein d'une suspension de cellules végétales. Le groupe de Stehfest (2003) a réussi à détecter l'acide rosmarinique, appartenant à la famille des acides phénoliques, dans des cellules végétales de *Lavandula*

*officinalis*. Les spectres ont été obtenus par un spectromètre FT-MIR couplé à un microscope IR sur une plaque multi-puits en cristal ZnSe. Les suspensions ont été déposées, séchées puis analysées. L'étude a concerné deux types d'analyse. D'abord une analyse qualitative permettant de caractériser les pics de l'acide rosmarinique. Un accent a été mis sur la région spectrale incluse entre 1800 et 700  $\text{cm}^{-1}$ . Ensuite une analyse quantitative a été menée en corrélant les différentes concentrations de l'acide rosmarinique prédites par FT-MIR aux valeurs de référence obtenues par HPLC, via un modèle de régression PLS. Le modèle a été validé par une application d'une cross-validation qui a révélé une bonne corrélation égale à 0,97.

En conclusion, la spectroscopie IR présente un réel potentiel pour l'analyse de matrices végétales grâce à sa rapidité, sa précision, sa globalité, son caractère peu destructif et sa simplicité. De plus, différentes études ont montré que les réponses spectrométriques sont corrélées positivement à celles des méthodes de référence et, grâce à l'accessoire ATR, il est possible de traiter des échantillons présents sous forme liquide ou solide. Enfin, rappelons que cette approche ne requiert pas ou peu l'usage de solvants, ce qui est en fait une technique respectueuse de l'environnement. Elle semble donc être un bon candidat pour des analyses de qualité et pour la détermination du profil en composés phénoliques d'une matrice végétale.



# PARTIE EXPÉRIMENTALE

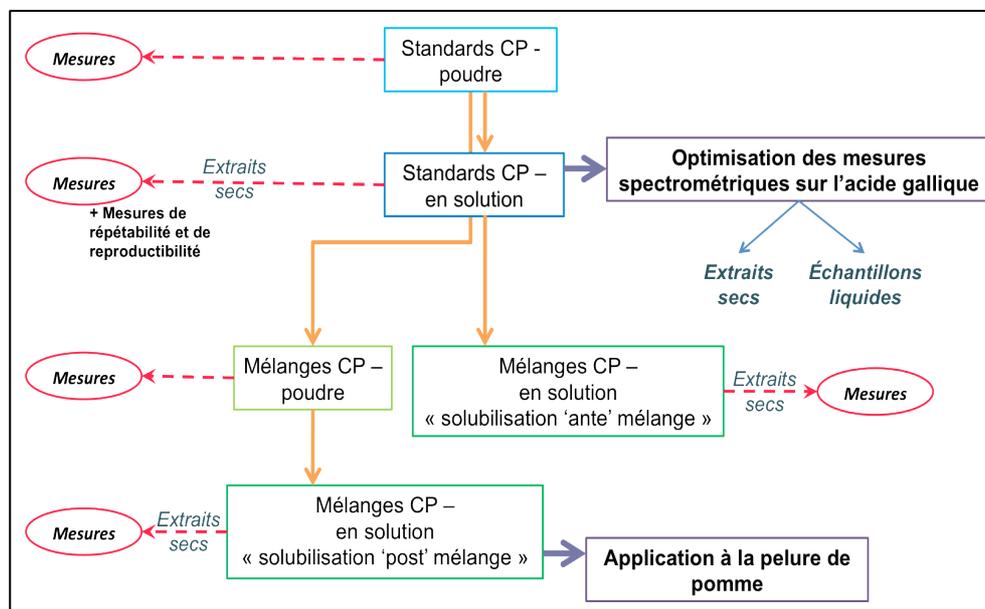
---

*L'objectif est de développer et d'optimiser une méthode basée sur la spectroscopie FT-MIR pour détecter et identifier les composés phénoliques.*



# 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La préparation et l'analyse de l'ensemble des échantillons traités, ont été réalisées selon la démarche présentée à la Figure 15.



**Figure 15 : Etapes de préparation des standards, de composés phénoliques purs et en mélanges, et mesures spectrales réalisées**

Légende : CP = composés phénoliques

Dans un premier temps, les standards ont été mesurés sous forme de poudre par le spectromètre FT-MIR. Cela constitue les mesures de référence. Dans un second temps, des mélanges simples d'acides phénoliques sont constitués. Les mélanges sont réalisés sous forme solide et liquide en solubilisant les composés phénoliques concernés dans de l'éthanol à 96%. Avant d'effectuer les mesures spectrales des standards et des mélanges de composés phénoliques en solution, la méthode d'acquisition a été optimisée sur l'acide gallique. L'optimisation a porté d'une part sur la mesure de solutions sous forme solide (extrait sec) et d'autre part sur la mesure de solutions sous forme liquide. La méthode des extraits secs a été appliquée afin d'améliorer le ratio Signal sur Bruit des mesures spectrales des solutions phénoliques. Cette démarche s'est avérée plus performante pour l'analyse des solutions à faible concentration et a donc été appliquée aux échantillons solubilisés. La technique « solubilisation 'post' mélange » (voir détails ci-dessous) a, quant à elle, été sélectionnée pour l'analyse d'un échantillon de pelures de pommes lyophilisées. Cette analyse sera utilisée pour évaluer la méthode élaborée pour la détection et l'identification de composés phénoliques.

# 1. DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS ANALYSES

## 1.1 STANDARDS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Le CRA-W dispose de quarante standards de composés phénoliques appartenant aux familles des acides phénoliques, des flavonoïdes, des stilbènes et des tannins (L'Annexe I reprend la liste et les structures chimiques des standards analysés). Tous les standards de composés phénoliques sont présents sous forme de **poudres**. Certains d'entre-eux, intervenant dans la composition de nos mélanges, ont été solubilisés. Les composés phénoliques étant peu solubles dans l'eau, ils ont été solubilisés dans **l'éthanol** à 96%, solvant organique polaire facile à utiliser, peu dangereux, peu onéreux et utilisé pour l'extraction de composés phénoliques présents dans les matrices végétales (Lu et Yeap Foo 1999, Queji *et al.* 2009).

### 1.1.1 PRÉPARATION DES STANDARDS SOUS FORME DE POUDRES

Les standards des composés phénoliques n'ont pas besoin de traitement particulier avant la mesure des spectres. En effet, l'accessoire ATR permet l'analyse des poudres et l'obtention d'un spectre d'une haute qualité grâce à l'utilisation d'une presse intégrée à l'accessoire.

### 1.1.2 MISE EN SOLUTION DES STANDARDS

Avant de mesurer les spectres MIR des standards et des mélanges en solution, les paramètres susceptibles d'influencer la qualité des spectres ont été optimisés au moyen de six solutions d'acide gallique allant de 50 à 1000 ppm.

Plusieurs paramètres sont susceptibles d'influencer la qualité des spectres collectés. Dans ce travail, une optimisation des paramètres suivants a été réalisée : la nature et la présentation de l'échantillon (solide ou liquide), le nombre de scans, la fréquence d'acquisition du background et le volume d'échantillon déposé sur le cristal..

#### 1.1.2.1 MISE EN SOLUTION D'ACIDE GALLIQUE POUR L'OPTIMISATION DES PARAMETRES DE MESURE

Pour obtenir les solutions d'acide gallique, 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 autres solutions sont réalisées par simple dilution : un volume déterminé de la solution de 1000 ppm (Tableau 1) est prélevé et déposé dans un ballon jaugé de 25 ml. Le volume est porté au trait de jauge avec l'éthanol à 96% et le ballon jaugé est ensuite agité pour homogénéiser la solution.

**Tableau 1 : Volumes nécessaires pour réaliser les solutions à base d'acide gallique.**

	<b>50 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>200 ppm</b>	<b>500 ppm</b>	<b>800 ppm</b>
<b>Volume prélevé dans la solution mère</b>	0,5 ml	2,5 ml	5 ml	12,5 ml	20 ml
<b>Volume d'éthanol ajouté</b>	24,5 ml	22,5 ml	20 ml	12,5 ml	5 ml

### *1.1.2 MISE EN SOLUTION DE STANDARDS D'ACIDES PHÉNOLIQUES*

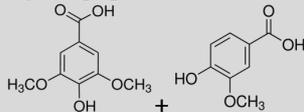
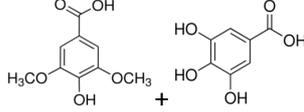
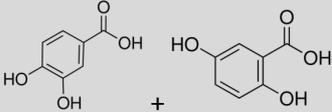
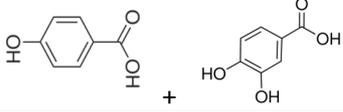
Les standards à la base des mélanges d'acides phénoliques (Tableau 2) ont été mis en solution dans l'éthanol à 96%, à la concentration de 200 ppm. Pour cela, 10 mg de chaque standard à été pesé, déposé dans un ballon de 50 ml et solubilisé par ajout d'éthanol jusqu'au trait de jauge. Ces solutions serviront à la réalisation de mélanges mais seront également mesurées en tant que telles.

### 1.2 MÉLANGES D'ACIDES PHÉNOLIQUES

Les acides hydroxybenzoïques, de la famille des acides phénoliques, ont été choisis pour réaliser les premiers mélanges. Quatre mélanges binaires ont été préparés à partir d'acide syringique, d'acide vanillique, d'acide gallique, d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, d'acide 3,4-dihydroxybenzoïque et d'acide 4-hydroxybenzoïque (Tableau 2). Ces composés ont été sélectionnés pour leur ressemblance. En effet, l'acide syringique et l'acide vanillique diffèrent par la présence d'un groupement OCH<sub>3</sub> supplémentaire sur le carbone 5 de l'acide syringique ; l'acide syringique et l'acide gallique diffèrent par la présence de groupements OCH<sub>3</sub> sur les carbones 3 et 5 de l'acide syringique au lieu de groupements OH chez l'acide gallique ; l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque diffèrent par la position de leurs groupements OH ; l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque diffèrent par la présence d'un groupement OH supplémentaire sur le carbone 3 de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque.

Les mélanges ont été présentés à l'appareil d'une part sous forme solide et d'autre part sous forme liquide, après solubilisation dans l'éthanol à 96%.

Tableau 2 : Composition des mélanges d'acides phénoliques analysés

	Nom des acides phénoliques et structure chimique
Mélange 1	Acide syringique + acide vanillique 
Mélange 2	Acide syringique + acide gallique 
Mélange 3	2,5-dihydroxybenzoïque + 3,4-dihydroxybenzoïque 
Mélange 4	4-hydroxybenzoïque + 3,4-dihydroxybenzoïque 

### 1.2.1 PRÉPARATION DES MÉLANGES SOUS FORME DE POUDRE

Après avoir pesé séparément chacun des standards, les acides phénoliques sont associés comme ci-dessus, en s'inspirant de la méthode « Step Wise Dilution » (Veys *et al.* 2006). La méthode consiste à incorporer petit à petit chacun des deux composés à la spatule dans un flacon. Cette étape est considérée comme la plus importante car le mélange doit être le plus homogène possible.

### 1.2.2 MISE EN SOLUTION DES MÉLANGES

Les mélanges d'acides phénoliques sont préparés à la concentration de **200 ppm**. Sachant qu'il est difficile d'obtenir un mélange homogène sous forme solide, une méthode avec pré-solubilisation des standards est réalisée parallèlement à la technique consistant à mettre directement en solution le mélange de deux poudres. Dans la première méthode, 5 mg de poudres initialement mélangées (voir point 1.2.1) sont solubilisés dans l'éthanol à 96%. Ce sont les échantillons « **solubilisation 'post' mélange** ». Dans la seconde méthode, chaque acide phénolique est solubilisé dans l'éthanol à 96% pour obtenir une concentration de 400 ppm. Ce sont les solutions dites de référence. Ensuite 15 ml de chacune des solutions de référence sont prélevés et déposés dans un ballon. Cela constitue l'échantillon « **solubilisation 'ante' mélange** ».

### 1.3 PELURES DE POMMES

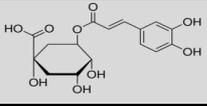
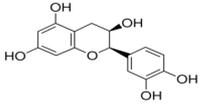
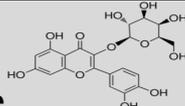
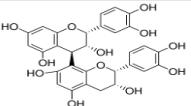
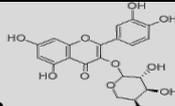
Des extraits de pelures de pommes provenant de la collection du CRA-W ont été utilisés dans le but de confronter la démarche développée et optimisée sur l'analyse de composés phénoliques. Les pommes ont été d'abord pelées. Les pelures obtenues ont ensuite été lyophilisées et broyées pour obtenir une poudre de pelures de pommes. Une partie de la poudre est analysée telle quelle, tandis que les composés phénoliques seront extraits du restant de poudre par une extraction hydro-alcoolique.

En parallèle, des mélanges de standards de plusieurs composés phénoliques susceptibles d'être présents dans les pelures de pommes ont été constitués dans le but d'être comparés aux mélanges réels de composés phénoliques présents dans les extraits de pelures de pommes.

#### **1.3.1 PRÉPARATION DU MÉLANGE SYNTHÉTIQUE**

D'après Khanizadeh *et al.* (2008), la pelure de pommes est principalement composée d'**épicatechine**, de **procyanidine B2**, de **quercétine-3-galactoside**, de **cyanidine-3-galactoside**, d'**acide chlorogénique** et de **quercétine-3-arabinoside**. A l'exception de la cyanidine-3-galactoside, dont le CRA-W ne disposait pas de standards, tous les composés ont été solubilisés dans de l'éthanol à 96% en vue d'obtenir des solutions de concentration égale à 200 ppm. Comme les standards ne sont pas présents en proportion égale dans les pelures de pommes (Tableau 3), une approximation des concentrations (concentration app.) a été réalisée à l'aide du rapport entre la concentration mesurée pour le standard et la somme des standards mesurés (TPC), tous deux déterminés par Khanizadeh *et al.* (2008). La concentration du composé minoritaire est fixée à 200 ppm. La concentration des autres composés est ensuite déduite par une règle de trois (Tableau 3). Le mélange des standards est effectué selon la technique « **solubilisation 'post' mélange** ». Autrement dit, les standards sont pesés (Tableau 3) et mélangés manuellement avant d'être solubilisés dans un ballon jaugé de 10 ml d'éthanol à 96%.

**Tableau 3 : Composition principale en composés phénoliques de pelure de pommes (valeurs de la littérature<sup>18</sup> et mélange synthétique)**

Composés phénoliques	Proportion (%TPC)	Concentration app. (ppm)	Masse (mg)
 <b>Acide chlorogénique</b>	0,13	200	2
 <b>Epicatechine</b>	0,27	400	>4
 <b>Quercétine-3-galactoside</b>	0,19	290	<3
 <b>Procyanidine B2</b>	0,20	300	>3
 <b>Quercétine-3-arabinoside</b>	0,13	200	2

### ***1.3.2 MISE EN SOLUTION DES PELURES DE POMMES ET LEURS EXTRAITS PHÉNOLIQUES***

Les pelures de pommes ainsi que son extrait phénolique sont mis en solution dans l'éthanol à la concentration de 200 ppm. Pour réaliser cette opération, 2 mg de chacune des deux poudres sont solubilisés dans l'éthanol à 96%.

Lors de la préparation des échantillons, il s'est avéré que la poudre de pelures de pommes ne se solubilisait pas dans l'éthanol. L'échantillon n'a donc pas pu être analysé sous forme liquide. La poudre de l'extrait phénolique ne s'est pas solubilisée instantanément dans l'éthanol mais elle s'est totalement solubilisée, après un passage de quinze minutes dans un bain à ultrason (la température du bain n'excédant pas 30°C) et a donc pu être analysée selon la technique des extraits secs. Le bain à ultrasons produit des vibrations qui permettent d'éclater les agglomérats de molécules ou de particules de poudre.

<sup>18</sup> Source : Khanizadeh et al. 2008

## 2. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons sont mesurés par un spectromètre FT-MIR Vertex 70 (Bruker optics, Ettlingen, Allemagne) muni d'un accessoire ATR Golden Gate. Toutes les mesures sont répétées trois fois (deux fois pour les standards sous forme de poudre) à température ambiante avec un nombre de scans égal à 64 et une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>. La plage spectrale est comprise entre 4000 et 600 cm<sup>-1</sup>. Après avoir acquis le spectre du background (mesure de référence), l'échantillon est déposé directement sur le cristal pour assurer un contact optimum avec le diamant. Une fois la mesure prise, l'échantillon est éliminé au moyen d'un chiffon imbibé d'éthanol. Lorsque le cristal est bien nettoyé, une nouvelle mesure peut être prise.

### 2.1 STANDARDS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

#### **2.1.1 ANALYSE DES STANDARDS SOUS FORME DE POUDRE**

L'accessoire ATR permet l'analyse des poudres et l'obtention d'un spectre d'une haute qualité grâce à l'utilisation d'une presse intégrée à l'accessoire qui permet d'assurer un contact optimum entre le cristal et l'échantillon.

L'analyse des poudres est simple et rapide. Le background est réalisé sur l'air ambiant. Une pointe de spatule de poudre (équivalent à quelques milligrammes) est déposée directement sur le cristal puis comprimée contre celui-ci au moyen de la presse. La mesure est immédiatement réalisée.

#### **2.1.2 ANALYSE DES STANDARDS SOUS FORME DE SOLUTIONS**

##### **2.1.2.1 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE MESURES**

Deux méthodes étaient possibles pour l'analyse des solutions : soit en mesurant l'échantillon en phase liquide (« **échantillon liquide** »), soit en mesurant l'échantillon en phase solide (« **extrait sec** »). Pour évaluer ces deux options, six solutions d'acide gallique ont été préparées (point 1.1.2.1). Les solutions d'acide gallique ont d'abord été mesurées en phase liquide. L'éthanol mesuré avec l'échantillon a été soustrait grâce à l'acquisition d'un background, précédant la mesure, sur l'éthanol à 96%. Ensuite, nous nous sommes tournés vers la méthode des extraits secs qui permet de mesurer le résidu des solutions après évaporation du solvant sur l'ATR (le background est dans ce cas effectué sur l'air ambiant). L'optimisation a été réalisée sur les deux types d'échantillons (liquides et extrait sec).

ÉCHANTILLONS LIQUIDES

Les mesures, en phase liquide, n'ont pas permis d'obtenir des spectres de bonne qualité. Les analyses ont dès lors été abandonnées. En effet, les faibles concentrations sont à **la limite du seuil de détection** de l'appareil puisque les mesures se font en réflexion et non en transmission.

EXTRAITS SECS

La mesure des échantillons liquides sous la forme d'un extrait sec est particulière. En effet, après avoir nettoyé le cristal de l'ATR au moyen d'un chiffon imbibé d'éthanol, le spectre de l'air ambiant est mesuré en tant que background. Notons qu'il est important de ne pas avoir de traces d'éthanol, issu du chiffon, dans le spectre car cela pourrait interférer avec la mesure de l'échantillon. Puis, La solution est déposée sur le cristal. La mesure n'est prise qu'une fois l'éthanol, présent dans la solution, entièrement évaporé. L'éthanol est un solvant assez volatile, son évaporation prend donc environ 2 minutes et est suivie visuellement sur la surface du cristal de l'ATR.

Afin d'analyser, au mieux, les extraits secs des standards et mélanges de composés phénoliques, la fréquence d'acquisition du background, le volume d'échantillon à déposer et le nombre de scans ont été étudiés. La fréquence d'acquisition du background, réalisé sur l'air, a été optimisée en premier lieu. Pour ce faire, une comparaison mathématique, au moyen du RMS, de la répétabilité a été réalisée entre les spectres mesurés après la prise d'un nouveau background pour chaque nouvelle mesure spectrale de l'échantillon et ceux mesurés lorsqu'un unique background est acquis avant la mesure successive de plusieurs prélèvements d'un même échantillon. Rappelons que 3 specres sont mesurés systématiquement pour chaque échantillon.

En ce qui concerne le volume de solution déposée, trois volumes ont été testés et comparés : 50, 80 et 100  $\mu\text{l}$ . Finalement, l'influence du nombre de scans (32, 64 et 128) en fonction de la concentration (50, 100 et 200 ppm) a été évaluée par le RMS des spectres mesurés. Les concentrations supérieures à 200 ppm n'ont pas été prises en compte car nous souhaitons travailler avec une concentration aussi faible que possible.

*2.1.2.2 ANALYSE DES STANDARDS D'ACIDES PHENOLIQUES*

Les standards à la base des mélanges d'acides phénoliques (Tableau 2) ont été mis en solution et analysés sous forme d'un **extrait sec**. La méthode des extraits secs a été choisie car elle améliore le ratio Signal sur Bruit des mesures spectrales et bénéficie d'une bonne répétabilité vérifiée lors des tests réalisés sur l'acide gallique (*Annexe IV*). Pour la mesure des extraits secs de ces échantillons, un volume de 80  $\mu\text{l}$  est déposé sur le cristal. Un nouveau background réalisé sur l'air ambiant est pris entre chaque mesure spectrale.

Afin de **valider la méthode** d'analyse, une étude de répétabilité a été réalisée sur les extraits secs des huit standards. Vingt spectres de chaque échantillon ont été successivement mesurés afin de contrôler la répétabilité de la technique de mesure. De plus, les mêmes solutions de standards ont été préparées à trois reprises puis analysées (dix spectres par échantillon), à trois périodes distinctes pour s'assurer de la reproductibilité.

## 2.2 MÉLANGES

La mesure spectrale des poudres, de mélanges d'acides phénoliques d'une part et de pelures de pommes d'autre part, est réalisée de la même manière que ce qui a été décrit pour les standards (point 2.1.1). Quant aux solutions, elles ont été analysées sous forme d'extrait sec selon le même protocole que les standards en solution (point 2.1.2.2).

## 3. TRAITEMENTS DES DONNÉES SPECTRALES

Deux grands types de tests ont été réalisés sur les spectres mesurés via le spectromètre FT-MIR.

D'un part, dans l'optique de réaliser une **ACP**, deux genres de prétraitements ont été appliqués : la **dérivée première** et/ou la **SNV**. Ces traitements, ainsi que l'ACP, ont été accomplis avec le logiciel The Unscrambler® X 10.1 (CAMO software, Oslo, Norvège). Plusieurs ACP ont été réalisées sur les spectres moyens des standards de composés phénoliques sous forme de poudre dans le but de discriminer entre elles les différentes familles de composés phénoliques. Des ACP ont également été réalisées dans le cadre de l'étude de la reproductibilité.

D'autre part, afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode, le **RMS**, le **coefficient de variation** et une **ANOVA** ont été calculés avec le logiciel Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft corp., Redmond, USA).

Premièrement, ces éléments ont été appliqués à la détermination des paramètres optimaux et de la technique de mesure (échantillons liquides vs extrait sec) pour l'analyse des solutions. Deuxièmement, ils ont servis à évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la mesure spectrale.

Pour mesurer la répétabilité, vingt spectres des huit standards d'acides phénoliques, à la base des mélanges, ont été mesurés successivement. Le RMS de chaque standard a été calculée sur base de l'équation 6 (Partie théorique-Traitements de données spectrales). Les **RMS moyens** de chaque acide phénolique ont été ensuite calculés et comparés à une valeur RMS de référence. Cette dernière a été calculée sur base des répétitions de spectres enregistrées

pour un échantillon d'huile de référence (appelé MEDEO), habituellement utilisé, pour vérifier la stabilité de l'appareil. Le spectre de cette huile est mesuré chaque jour avant chaque série d'analyses et aussi en fin de journée. Le **coefficient de variation** de chaque standard a été évalué, selon l'équation 7 (Partie théorique-Traitements de données spectrales), pour déterminer les zones critiques (plus sensibles aux variations) des spectres.

Le but de noter étude de reproductibilité est d'étudier la variabilité entre des échantillons mesurés à trois moments différents (mois de mars, d'avril et de mai). Dix spectres ont été mesurés à chaque fois. Des analyses **ANOVA** ont été réalisés sur deux valeurs statistiques différentes, premièrement sur les **RMS** et ensuite sur les **coordonnées** selon la première composante d'une **ACP**, réalisée sur l'ensemble des échantillons. Le choix de la première composante se justifie par le fait que cette dernière explique une partie plus importante de l'information qui permet de caractériser chaque famille de composés phénoliques.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

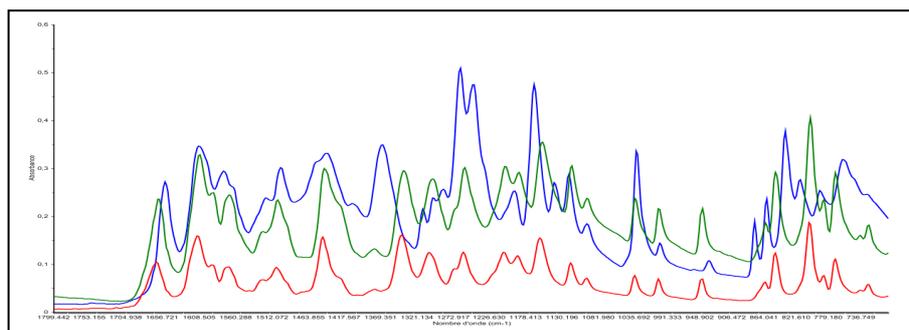
Avant de débiter l'analyse, tous les spectres ont été coupés, pour ne conserver que leur fingerprint, située entre 1800 et 700  $\text{cm}^{-1}$ , riche en informations. L'analyse des spectres récoltés va permettre d'atteindre plusieurs objectifs. Dans un premier temps, l'analyse des standards va mener à quatre résultats. Le premier concerne la discrimination entre différentes familles de composés phénoliques. Le second est la caractérisation spectrale des composés phénoliques et est synthétisé dans le Tableau 4 qui reprend les bandes d'absorption de l'ensemble des fonctions chimiques identifiées dans les composés phénoliques étudiés. Le troisième présente les résultats de l'optimisation des mesures spectrales en phase liquide (sur l'acide gallique). Le dernier concerne les hypothèses de répétabilité et de reproductibilité. Dans un second temps, nous allons nous intéresser aux mélanges. Les mélanges d'acides phénoliques ont pour objectif de sélectionner une technique de préparation et une méthode d'interprétation. Celles-ci seront finalement appliquées à un échantillon de pelures de pommes ainsi qu'à son extrait phénolique.

### 1. STANDARDS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

#### 1.1 ANALYSE DES SPECTRES DE STANDARDS SOUS FORME DE POUDRES

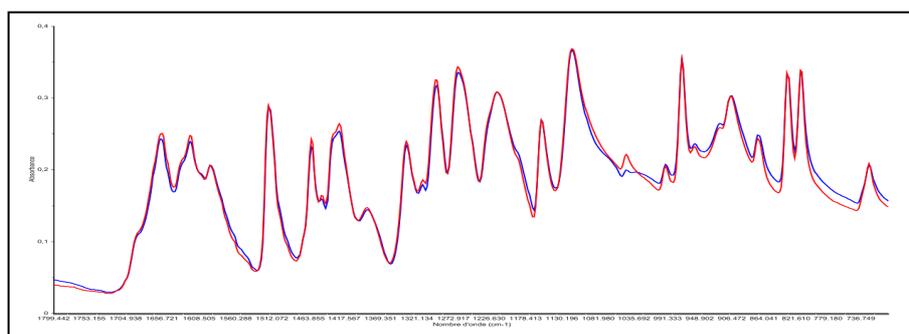
Les composés phénoliques présents sous forme de poudres, ont été mesurés individuellement (les spectres sont dans l'*Annexe II*). Puisque la compression de la poudre contre le cristal de la plaque ATR n'est pas automatisée, il est possible d'observer occasionnellement des différences d'absorbance pour un même échantillon. L'application d'une normalisation des spectres permettrait de palier en partie ce problème.

Parmi les quarante composés phénoliques disponibles au CRA-W, dix-huit proviennent d'au minimum deux firmes différentes. Les spectres d'un même composé, mais issus de firmes différentes, ont été superposés pour mettre en lumière d'éventuelles différences spectrales. Pour faciliter la comparaison des différences d'absorbances à chaque nombre d'onde, les spectres ont été normalisés. Les résultats (*Annexe II*) montrent que cinq composés sur dix-huit présentent des différences importantes selon qu'ils proviennent de l'une ou l'autre firme comme sur la Figure 16. Il s'agit de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, l'acide ellagique, l'acide gallique, la lutéoline et la quercétine.



**Figure 16 : Spectres MIR de la lutéoline. Fournisseurs : Sigma Aldrich (bleu), Extrasynthèse (rouge) et Cayman ChemicalCompany (vert).**

D'un autre côté, cinq composés phénoliques sur les dix-huit, l'acide sinapique, l'acide chlorogénique, l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque, le resvératrol et l'acide tannique, présentent uniquement des déplacements de bandes (**shift**) pour une ou deux régions du spectre (Figure 17).



**Figure 17 : Spectres MIR de l'acide sinapique. Fournisseurs : Sigma Aldrich (bleu) et Extrasynthèse (rouge).**

Les composés de spectres « identiques » regroupent quasi exclusivement des acides phénoliques. Aucune hypothèse ne peut être avancée pour le moment pour essayer d'expliquer les différences, parfois impressionnantes, observées pour certains composés. Une étude plus approfondie des différences observées et des analyses en chromatographie liquide sont envisagées dans le futur pour répondre à cette question. Néanmoins, les analyses FT-MIR montrent l'importance du contrôle des standards avant de réaliser une expérience puisque la réponse spectrale d'un composé peut être influencée par sa source.

Dans un premier temps une **ACP** a été appliquée sur l'ensemble des spectres afin d'étudier s'il était possible de discriminer les différentes familles de composés phénoliques. L'ensemble des composés a été pris en compte, quelle que soit la firme productrice. Dans un second temps, une **caractérisation spectrale** de tous les composés a été effectuée. Sur base de cette caractérisation, une discrimination des différentes familles a été établie et les pics caractéristiques de celles-ci ont été isolés.

### 1.1.1 DISCRIMINATION DES FAMILLES DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Une ACP a été réalisée sur les spectres des quarante standards. Celle-ci a permis de distinguer les différentes familles de composés phénoliques présentes (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les tannins) ainsi que le pyrocatechol, un phénol simple. Avant de réaliser une ACP, la moyenne des spectres de chaque échantillon a été réalisée. Un premier prétraitement, une **dérivée première**, appliquée avant l'ACP, a permis d'isoler le pyrocatechol des autres familles de composés phénoliques (Figure 18). Cette première ACP a été réalisée sur la totalité du spectre, s'étalant de 4000 à 600  $\text{cm}^{-1}$ .

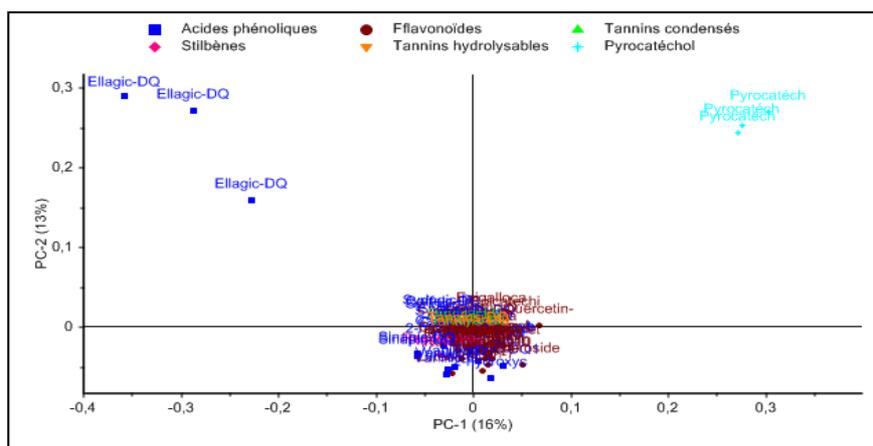


Figure 18 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur la totalité des spectres MIR, traités par dérivée I, des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés en famille sur base de leurs structures chimiques. Le pyrocatechol étant composé d'un noyau benzénique et de deux groupements hydroxyles (*Annexe I*) il n'appartient à aucune des familles décrites (dans la Partie théorique-Composés phénoliques) et sera donc exclu des autres études de discrimination. Remarquons également que **l'acide ellagique**, un acide phénolique, a tendance à se différencier du reste des composés phénoliques. Comme la dérivée première ne permet pas de distinguer correctement les groupes de composés phénoliques, un autre prétraitement, à savoir une **SNV**, a été appliqué aux spectres moyens des composés avant de réaliser une nouvelle ACP (*Annexe VII*). Cette nouvelle répartition permet une première **différenciation des familles** et particulièrement des acides phénoliques et des flavonoïdes. La famille des tannins hydrolysables, représentée par deux standards de procyanidines, et la famille des stilbènes, représentée par trois échantillons de resvératrol (issu de firmes différentes), ont tendance à se disperser.

En ciblant l'ACP sur la région fingerprint ( $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ) du spectre (Figure 19), la séparation des différentes familles est améliorée. Remarquons que l'acide tannique, représentant de la famille des **tannins hydrolysables** (en orange sur

la Figure 19), est proche de celui des acides phénoliques (en bleu). L'acide tannique étant un polymère d'acide gallique, un acide phénolique, il n'est pas surprenant de le retrouver près des acides phénoliques. De même, les **procyanidines**, de la famille des tannins condensés (en vert), sont des polymères de la catéchine (procyanidine B1) ou d'épicatéchine (procyanidine B2), appartenant à la famille des flavonoïdes (en rouge). Il est donc assez logique que ce sous-groupe soit inclu dans l'ensemble des flavonoïdes.

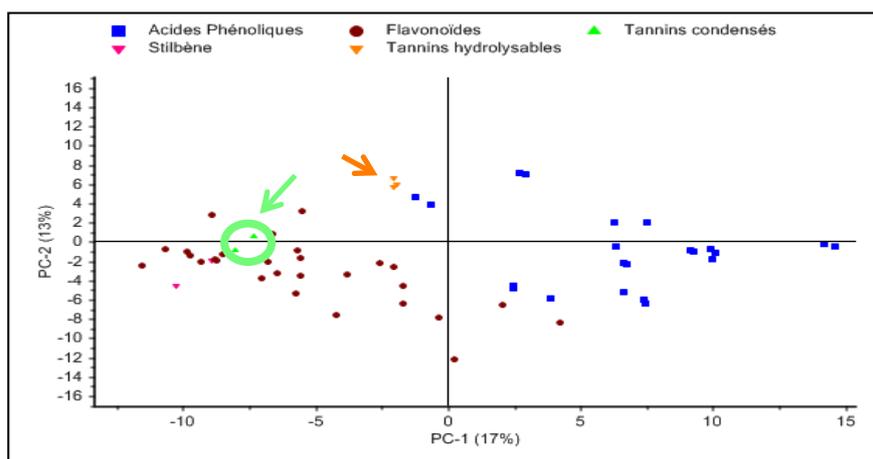


Figure 19 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des composés phénoliques. Le pyrocatéchol a été exclu de ce traitement de données

Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont les deux familles les mieux représentées, grâce à un nombre plus important d'échantillons utilisés, dans cette étude. Une quatrième ACP englobant uniquement ces deux familles a donc été réalisée, en suivant le même protocole que la troisième ACP. Comme présenté sur la Figure 20, il est possible de bien séparer les deux familles selon la première composante.

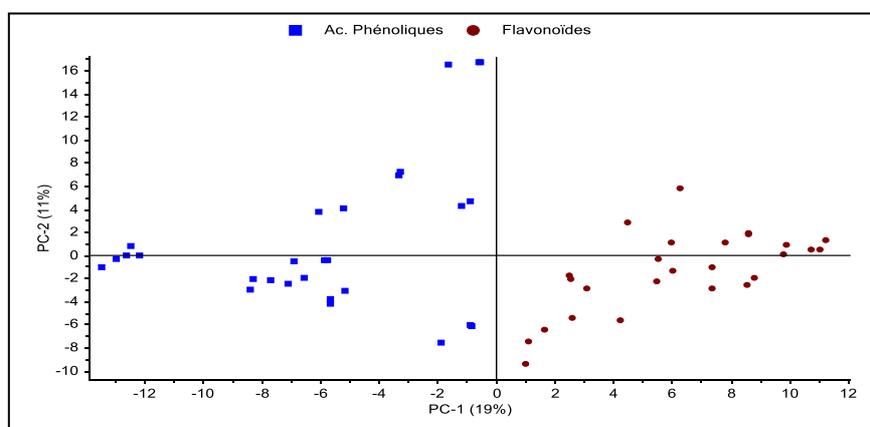
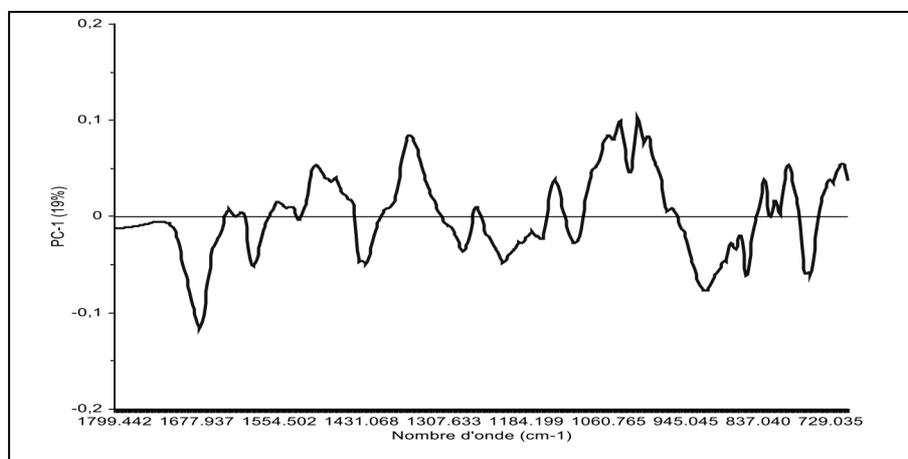


Figure 20 : Résultat de l'ACP (PC-1 vs PC-2) appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des acides phénoliques et des flavonoïdes

Le loading\* de la première composante aide à mettre en évidence les nombres d'onde caractéristiques des acides phénoliques (PC-1 négatives) et des flavonoïdes (PC-1 positives) (Figure 21). En *Annexe VII*, le Tableau 1 reprend les nombres d'onde associé aux pics.



**Figure 21 : Loading de la première composante, en fonction du nombre d'onde, de l'ACP appliquée sur les spectres MIR, traités par SNV, des acides phénoliques et des flavonoïdes**

Enfin, une cinquième ACP a été menée au sein de la **famille des flavonoïdes** (Figure 22). Dans ce cas-ci, l'ACP obtenue, après avoir traité les spectres par une dérivée première, a fourni une meilleure discrimination des composés que lors de l'application d'une SNV. Sur la représentation graphique, les sous-classes se détachent les unes des autres. En effet, les **anthocyanines** (en orange) sont regroupées dans le quadrant supérieur droit associé aux valeurs positives des première et deuxième composantes. Le groupe des **flavanols** (en rouge), contenant les catéchines et leurs dérivés, est caractérisé par la combinaison des coordonnées positives pour la première composante et pour des coordonnées négatives pour la deuxième composante. Les **flavanones** (en bleu) et les **isoflavones** (en vert) ne sont à chaque fois représentées que par un seul composé. Il serait donc hâtif de tirer des conclusions. Notons simplement que le groupe des flavanones est à la base de la synthèse des autres classes de flavonoïdes. Les **flavones** (en turquoise), représentées par la lutéoline et son dérivé glycosylé, peuvent être spécifiés par leurs coordonnées en première composante, quasi équivalentes. Finalement, le groupe des **flavonols** (en rouge foncé) est plus hétérogène que les autres. Sur la Figure 22, l'ensemble « Flavonol » se répartit essentiellement dans les coordonnées négatives de la première composante mais deux échantillons sont situés dans le quadrant supérieur droit, correspondant à la combinaison des coordonnées positives pour la première et la deuxième composante.

\* voir définition en Annexe IX

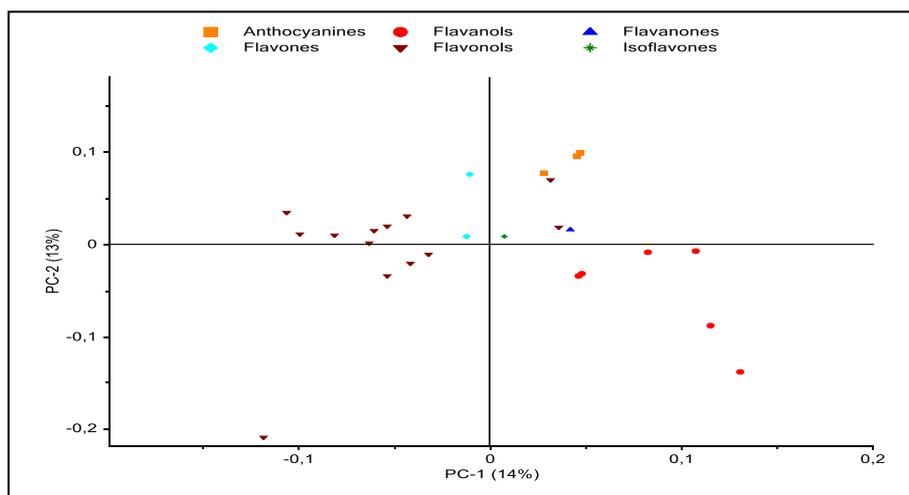


Figure 22 : Résultat de l'ACP (PC1 vs PC2) appliquée sur les spectres MIR, traités par dérivée I, des flavonoïdes

### 1.1.2 CARACTÉRISATION SPECTRALE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les pics présents dans les spectres obtenus à partir des standards ont été recensés. Le profil de chaque standard a été déterminé et interprété essentiellement au moyen du livre *Infrared Characteristic Group Frequencies* de Socrates G., 1997 (John Wiley & Sons). Une fois tous les composés caractérisés, les données ont été comparées en vue d'établir les zones spectrales caractéristiques des composés et de leur famille. Les informations obtenues sont résumées dans la Tableau 4, tandis que l'Annexe VI présente la caractérisation de chacun des composés.

Les **composés phénoliques** s'expriment essentiellement entre 1750 et 700  $\text{cm}^{-1}$ . La région entre 3500 et 3000  $\text{cm}^{-1}$  contient principalement des bandes larges associées aux vibrations d'élongation des fonctions hydroxyles qui ne sont pas spécifiques à un seul ou plusieurs composés phénoliques et n'apporte donc pas une grande aide pour la discrimination de familles de composés phénoliques. Trois fonctions chimiques particulières permettent d'englober l'ensemble des composés phénoliques. Ces fonctions sont associées aux vibrations des cycles aromatiques, des hydroxyles et des phénols et sont exprimées par tous les composés. La région qui s'étend de 1650 à 1590  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des C=C aromatiques. Des bandes aux environs de 1570  $\text{cm}^{-1}$  peuvent également être exprimées, tandis que les pics caractérisant plus spécifiquement les composés di- et tri-substitués sont situés entre 1525 et 1480  $\text{cm}^{-1}$ . Les vibrations d'élongation des C=C et des Ar=C-H aromatiques sont situées à 1525, 1470 et entre 1465 et 1430  $\text{cm}^{-1}$ . Pour clôturer les aromatiques, des vibrations de déformation dans le plan et hors du plan sont observées respectivement dans les régions 1225-950  $\text{cm}^{-1}$  et 900-670  $\text{cm}^{-1}$ . Les fonctions hydroxyles sont surtout caractérisées dans les régions associées au phénol.

Cependant, la gamme définissant la vibration d'élongation de la liaison C-O est observée entre 1310 et 1230  $\text{cm}^{-1}$  ainsi qu'un pic aux environs de 1045  $\text{cm}^{-1}$ . Concernant les phénols, les vibrations de déformation associées au groupement O-H et celles d'élongation associée à la liaison C-O sont localisées entre 1410 et 1310  $\text{cm}^{-1}$  (principalement des déformations O-H) et entre 1260 et 1180  $\text{cm}^{-1}$  (principalement des élongations C-O). Un pic aux alentours de 1440  $\text{cm}^{-1}$  caractérise la liaison C-O du phénol, alors que celui aux environs de 1110  $\text{cm}^{-1}$  identifie les liaisons C-H du phénol.

Les **acides phénoliques** (en vert dans la Tableau 4), tannins hydrolysables inclus, sont essentiellement caractérisés par la présence de la fonction carboxylate. En effet, parmi les composés phénoliques mesurés, ils sont les seuls à posséder cette fonction. Quatre régions sont associées à cette fonction : 1725-1680  $\text{cm}^{-1}$  pour les vibrations d'élongation des C=C ; 1320-1280  $\text{cm}^{-1}$  pour les vibrations de déformation des O-H ; 1190-1075  $\text{cm}^{-1}$  pour les vibrations d'élongation des C-O ; 955-915  $\text{cm}^{-1}$  pour les vibrations de déformation en dehors du plan des O-H. Les acides hydroxycinnamiques se distinguent par la présence de pics dans la gamme 1640-1610  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique des alcènes conjugués. Une différenciation entre les différents composés d'une même famille se fait selon la présence (ou l'absence) de groupes particuliers tels que les méthoxyles ou la position de substituants benzéniques. Les pics caractéristiques de ces derniers sont exprimés principalement dans la région située en dessous de 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Les **flavonoïdes** (tannins condensés inclus) sont caractérisés par deux types de structure chimique : d'une part le noyau pyrylium\* à la base des anthocyanidines et d'autre part la structure diphenylpropane (Figure 12) présente dans tous les groupes de flavonoïdes à l'exception des flavanols et des anthocyanines. Le cycle du noyau pyrylium (en rouge dans la Tableau 4) entre en vibration dans les bandes comprises entre 1650 et 1615  $\text{cm}^{-1}$ , 1560 et 1520  $\text{cm}^{-1}$ , 1520- et 1465  $\text{cm}^{-1}$ , 1450 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  et 1000 et 970  $\text{cm}^{-1}$ . De plus, la liaison du C-H entre en vibration de déformation hors du plan entre 960 et 900  $\text{cm}^{-1}$ . La liaison C=O de la structure diphenylpropane (en bleu dans la Tableau 4) entre quant à elle en vibration d'élongation dans la région de 1670 à 1625  $\text{cm}^{-1}$ . Cette structure est également particularisée par les gammes associées aux vibrations des liaisons C=O combinées et C=C déformées du  $\gamma$ -pyrone\* localisées à 1570-1540  $\text{cm}^{-1}$ , 1535-1525  $\text{cm}^{-1}$ , 1465-1445  $\text{cm}^{-1}$  et 1420-1400  $\text{cm}^{-1}$ . Tout comme pour les acides phénoliques, des distinctions entre les sous-classes et composés sont possibles de par la présence d'une fonction méthoxyle mais aussi par la présence de pyranose\*. Notons que tous les flavonoïdes possèdent au minimum une fonction éther. Celle-ci est représentée dans les régions 1310-1210  $\text{cm}^{-1}$ , 1200-1120  $\text{cm}^{-1}$  et 765-750  $\text{cm}^{-1}$  qui caractérisent respectivement les vibrations des liaisons R-O-Ar, C-O (élongation) et R-O-Ar.

\* voir définition en Annexe IX

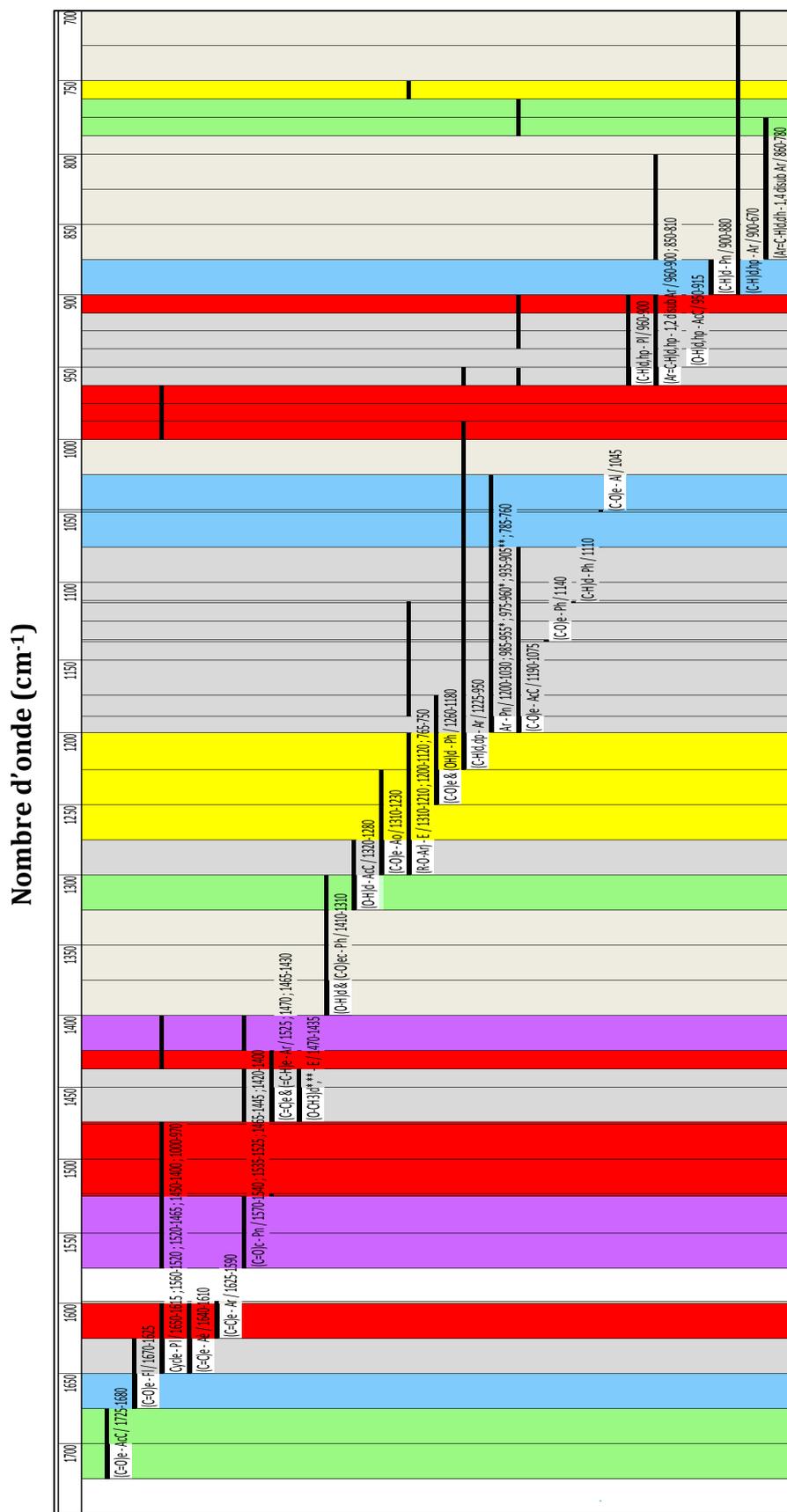
Cependant, ces bandes ne sont pas caractéristiques des flavonoïdes car elles se superposent à celles des phénols et des alcools.

Finalement la famille des **stilbènes** est ici représentée par le resvératrol. Celui-ci présente des pics d'absorption dans deux régions caractéristiques : la région 1640-1610  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des doubles liaisons C=C, et la région 860-780  $\text{cm}^{-1}$  qui est spécifique, dans ce cas-ci, au resvératrol puisqu'elle identifie les cycles aromatiques di-substitués en C1 et C4.

Les résultats obtenus par l'analyse de la première composante de l'ACP comparant la famille des acides phénoliques et celle des flavonoïdes (Figure 20 et Figure 21) sont en accord avec ceux de l'interprétation spectrale des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les gammes spectrales correspondant aux acides carboxyliques caractérisent les acides phénoliques. Parmi notre ensemble de composés phénoliques, la présence de composés di-substitués permet également leur identification. Quant aux flavonoïdes, plusieurs régions spectrales particulières associées au noyau pyrylium des anthocyanines, au noyau pyrone des flavones, flavanones et flavonols ainsi qu'à la présence de pyranose sur certains flavonoïdes, sont caractéristiques.

Ces résultats montrent que la spectroscopie MIR permet de caractériser chacune des familles de composés phénoliques étudiées.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des groupements caractéristiques en spectroscopie MIR associées aux composés phénoliques



Légende : AcC = acide carboxylique ; Fl = diphenylpropane ; Ar = cycle aromatique, Ar = alcène ; Pl = pyrylium ; E=éther ; Pn = pyrane ; Ph = phénol ; d = déformation ; e = élongation ; c = combinaison ; dp = dans le plan ; dp = hors du plan ; \* = symétrique ; \*\* = asymétrique

Zones caractéristiques des :

- Acides phénoliques : vert
- Flavonoïdes possédant un cycle diphenylpropane: rouge
- Anthocyanines : bleu
- Flavonoïdes : violet

## 1.2 ANALYSE DES SPECTRES DE STANDARDS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES EN SOLUTION

### **1.2.1 OPTIMISATION AU MOYEN DE L'ACIDE GALLIQUE**

Avant d'analyser les standards de composés phénoliques solubilisés, nous avons optimiser les paramètres susceptibles d'influencer la qualité des spectres collectés (à savoir : la nature et la présentation de l'échantillon (solide ou liquide), le nombre de scans, la fréquence d'acquisition du background et le volume d'échantillons déposés sur le cristal). Des solutions d'acide gallique, allant de 50 à 1000 ppm, ont été réalisées et analysées dans ce but. Dans un premier temps nous avons réalisé les mesures sur l'échantillon sous forme liquide. Ensuite, comme les résultats n'étaient pas probants, nous nous sommes tournés vers la méthode des extraits secs.

#### *1.2.1.1 ÉCHANTILLONS LIQUIDES*

Pour les mesures sous forme liquide, le spectre de l'acide gallique solubilisé est obtenu en soustrayant le spectre de l'éthanol (le solvant) au spectre de l'échantillon, grâce à l'acquisition d'un background précédent la mesure. Les spectres enregistrés étaient peu répétables du fait de la faible concentration des solutions (*Annexe IV*). En effet, les mesures sont réalisées en réflexion, ce qui ne permet pas d'acquérir des spectres de solutions de concentrations très faibles, contrairement ce que nous aurions pu avoir si nous travaillions en mode transmission. Aucune interprétation n'a pu être réalisée à partir de ces mélanges.

L'objectif étant de mettre au point une méthode rapide et facile d'utilisation pour l'analyse des composés phénoliques, nous n'avions pas opté pour les mesures en transmission. En effet, cette technique implique un nettoyage de la cellule de mesure après passage de chaque échantillon ce qui prendrait beaucoup plus de temps que ce que nous observons lors des analyses en ATR.

#### *1.2.1.2 EXTRAITS SECS*

Pour remédier aux problèmes liés à la mauvaise répétabilité des mesures d'acide gallique sous forme liquide, nous nous sommes tournés vers la méthode des extraits secs. Celle-ci consiste à prendre la mesure de l'échantillon lorsque l'éthanol est évaporé du cristal de l'accessoire ATR. Cette méthode fournissant de bons résultats, nous l'avons conservé pour optimiser les paramètres susceptibles d'influencer la qualité des spectres collectés. En effet, comme il est possible de le voir sur la Figure 23, le coefficient de variation obtenu pour les extraits secs est plus faible et surtout est plus stable que celui des échantillons mesurés en phase liquide.

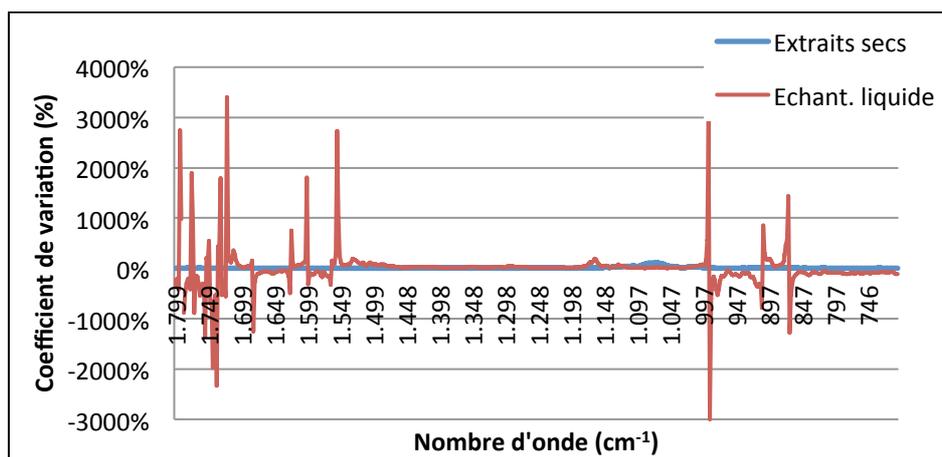


Figure 23 : Coefficient de variation le long du fingerprint (1800-700  $\text{cm}^{-1}$ ) : échantillon liquide (rouge) et extraits secs (bleu)

Plusieurs essais, pour évaluer la nécessité d'acquérir un **background** entre les différentes répétitions des mesures spectrales de chaque échantillon, ont révélé l'importance de cette étape pour l'obtention d'une bonne répétabilité spectrale (*Annexe IV*). La prise d'un nouveau background entre chaque mesure est donc appliquée pour la mesure de l'extrait sec d'une solution.

Le **volume** de 80  $\mu\text{l}$  d'échantillon déposé sur le cristal est adopté pour obtenir un bon compromis entre le temps d'attente pour l'acquisition du spectre et la répétabilité de la mesure. En effet, plus le volume d'échantillon déposé augmente, plus il y a d'éthanol à évaporer, augmentant ainsi le temps de séchage. La Figure 24 représente le fingerprint de la solution à 1000 ppm d'acide gallique suivant que la mesure ait été prise après dépôt de 50, 80 ou 100  $\mu\text{l}$  de la solution. Remarquons que l'intensité des pics pour les volumes de 80 et 100  $\mu\text{l}$  est semblable. Autrement dit, au-delà de 80  $\mu\text{l}$ , le faisceau traverse la même microcouche d'échantillon, alors qu'en dessous de 80  $\mu\text{l}$ , l'échantillon est peut-être trop dispersé et le faisceau mesure également de l'air. Puisque le temps d'évaporation de l'éthanol est corrélé positivement au volume d'échantillon déposé, le prélèvement de 80  $\mu\text{l}$  d'échantillon sera conservé pour la suite des mesures. De plus, cela évite un gaspillage de l'échantillon.

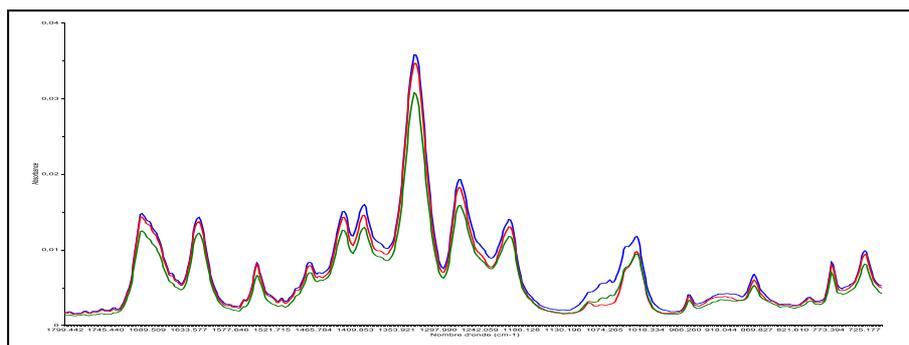


Figure 24 : Spectres MIR de l'extrait sec de l'acide gallique (solution à 1000 ppm) si le volume de solution déposé sur le cristal vaut 100 µl (bleu), 80 µl (rouge) ou 50 µl (vert)

En ce qui concerne le **nombre de scans** et la **concentration** minimale de détection, les résultats montrent que le meilleur compromis, et donc la meilleure répétabilité (soit un RMS moyen minimum), est de réaliser des solutions de 200 ppm et de les mesurer avec un nombre de scans égal à 64. Trois spectres pour les solutions de 50, 100 et 200 ppm ont été mesurés en fonction de trois nombres de scans différents (32, 64 et 128). Les RMS des 27 spectres ont été calculés. Ensuite, nous avons évalué le RMS moyen pour chaque nombre de scans à une concentration donnée. Les résultats sont représentés à la Figure 25. Notons que les solutions supérieures à 200 ppm n'ont pas été étudiées car nous voulions choisir la concentration minimale, capable de fournir des résultats spectraux répétables et avec un bon rapport Signal sur Bruit.

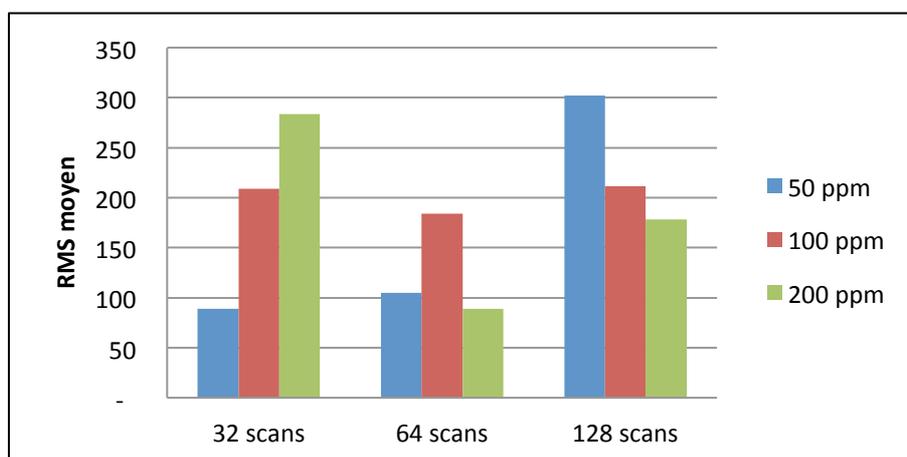


Figure 25 : RMS moyen en fonction de la concentration de la solution d'acide gallique et du nombre de scans

## 1.2.2 RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ DES MESURES SPECTRALES DES STANDARDS D'ACIDES PHÉNOLIQUES

### 1.2.2.1 REPETABILITE

Afin de valider la méthode d'analyse, une étude de répétabilité a été réalisée sur les extraits secs des huit standards d'acides phénoliques utilisés dans la réalisation des mélanges (Matériel et méthodes-1.1.2.2). Vingt spectres de chaque échantillon ont été successivement mesurés afin de contrôler la répétabilité de la technique de mesure.

Le RMS et le coefficient de variation moyen de chacun des huit standards ont été calculés sur le fingerprint des spectres pour évaluer la répétabilité de la technique. Dans la littérature, il existe peu de valeurs de référence pour ces indices. C'est pourquoi, la RMS d'une huile, nommée « MEDEO », présentant une bonne stabilité en spectrométrie MIR, a été calculée et utilisée comme valeur de référence pour estimer la répétabilité de la technique.

La comparaison des valeurs moyennes des **RMS** (Figure 26), indique que la répétabilité de la technique « extrait sec » est correcte. En effet, à l'exception de l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque et de l'acide 3,4 dihydroxybenzoïque, tous les standards présentent un RMS moyen inférieur à celui de Medeo. La répétabilité de l'acide vanillique est la meilleure, avec un RMS moyen inférieur à 200. La différence observée entre les composés est probablement due à des différences de stabilité, de cristallisation et de recristallisation des molécules au moment de la mesure. Concernant l'acide 3,4 dihydroxybenzoïque, nous avons soulevé la présence de différences spectrales entre les échantillons issus de firmes différentes au point 1.1 de ce chapitre. La présence d'impuretés pourrait moduler le comportement du standard, ce qui expliquerait pourquoi les deux acides 3,4 dihydroxybenzoïques ne se comportent pas de manière équivalente.

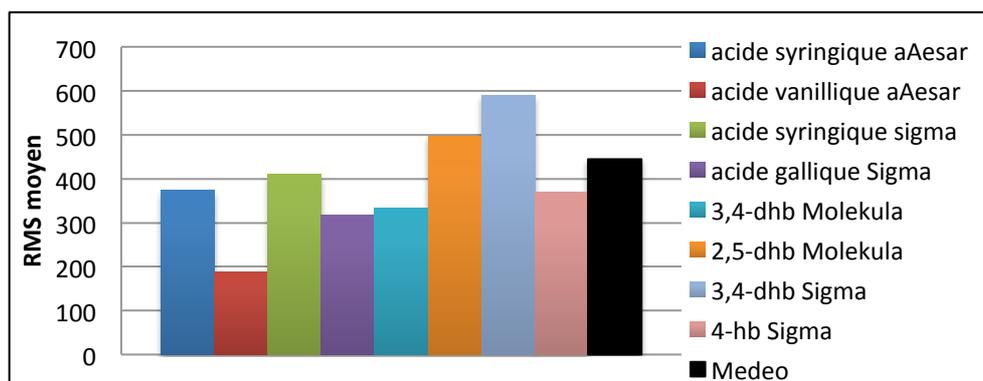
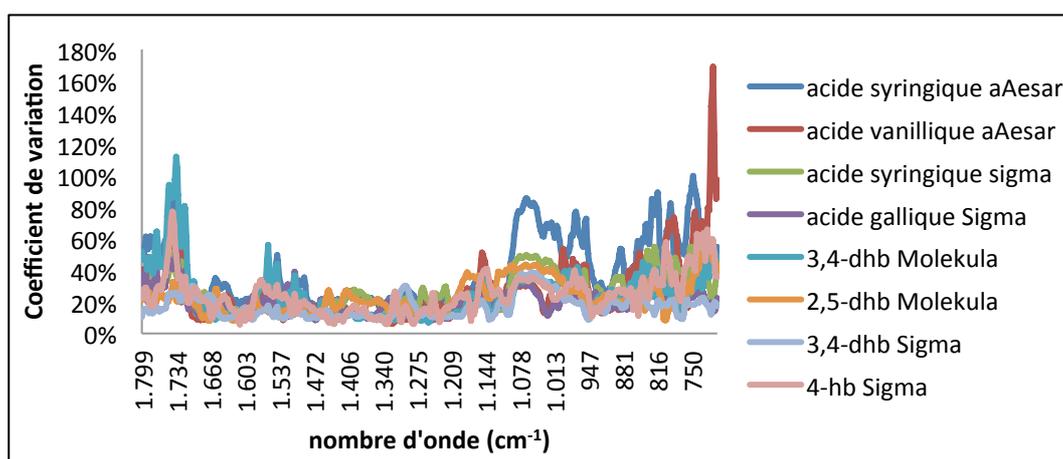


Figure 26 : RMS moyen des huit standards d'acides phénoliques et de « Medeo »

Légende : dhb = dihydroxybenzoïque, hb = hydroxybenzoïque

Le **coefficient de variation** permet de mettre en évidence les zones les plus variables dans la région du fingerprint. A la Figure 27, trois zones sont plus sensibles : une première s'étendant de 1780 à 1700 $\text{cm}^{-1}$ , une deuxième de 1100 à 1000  $\text{cm}^{-1}$  et une troisième de 900 à 700 $\text{cm}^{-1}$ . La première comporte beaucoup de bruits. La seconde correspond à la zone d'expression des fonctions hydroxyles des alcools. Comme les poudres de composés phénoliques sont solubilisées dans de l'éthanol, il n'est pas surprenant de retrouver des variations à cet endroit. En effet, après évaporation de l'éthanol, des traces de celui-ci peuvent être toujours présentes pendant la mesure et influencer cette dernière. Le dernier intervalle comprend des bandes correspondant aux vibrations de déformation des cycles aromatiques. Ces bandes sont généralement de faible intensité et donc avec un rapport Signal sur Bruit plus élevé. Autrement dit, la technique des extraits secs peut être appliquée aux échantillons en prenant garde durant l'interprétation des variations observées au niveau des régions précitées.



**Figure 27: Coefficient de variation des huit standards d'acides phénoliques en fonction du nombre d'onde**

Légende : dhb = dihydroxybenzoïque, hb = hydroxybenzoïque, syr = syringique

### 1.2.2.2 REPRODUCTIBILITE DES STANDARDS

Les mêmes standards ont été utilisés pour mener un test de répétabilité. Les solutions, à base des huit standards d'acides phénoliques, ont été préparées à trois reprises puis analysées (dix spectres par échantillon), à trois périodes distinctes.

Les analyses statistiques du type **ANOVA** à un facteur ont permis de mettre en évidence le facteur « mois » au sein de chacun des standards (Tableau 5), autrement dit, l'influence du jour de mesure sur la réponse spectrale qui peut être obtenue. L'objectif est de vérifier que les mesures sont répétables dans le temps et avec différentes préparations d'échantillon. L'ANOVA a été réalisée sur

deux types de traitements. La première ANOVA traite les données des coordonnées de la première composante d'une ACP réalisée après un prétraitement par dérivée première et une SNV (*Annexe VIII*). Nous avons choisi de travailler avec les coordonnées de la première composante car cette dernière explique une partie plus importante de l'information présente dans l'échantillon. La seconde ANOVA est appliquée aux RMS des spectres mesurés.

**Tableau 5 : p-valeur des ANOVA à un facteur pour la reproductibilité des mesures de différents composés phénoliques en spectroscopie MIR**

Acides phénoliques	SNV + Dérivée 1 <sup>ère</sup>	RMS
acide Syringique aAesar	0,004	0,001
acide Vanillique aAesar	0,157	$6,5 \cdot 10^{-6}$
acide Syringique Sigma	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,429
acide Gallique Sigma	0,645	0,012
acide 3,4-Dihydroxybenzoïque Molekula	0,682	0,428
acide 2,5-Dihydroxybenzoïque Molekula	0,528	0,302
acide 3,4-Dihydroxybenzoïque Sigma	0,806	0,221
acide 4-Hydroxybenzoïque Sigma	0,49	0,467

L'analyse ANOVA, réalisée sur la coordonnée de la première composante d'une ACP réalisée sur les spectres traités par une SNV et une dérivée première, conclut à un rejet de l'égalité des moyennes (et donc de la reproductibilité) dans le cas des **acides syringiques**. En effet, la p-valeur (Tableau 5) est inférieure aux 5%, correspondant à notre seuil d'acceptabilité. Il est possible de voir sur le graphe de l'ACP (*Annexe VII*) que le nuage de points correspondant aux acides syringiques a tendance à se disperser plus que pour les autres composés. De plus, plusieurs mesures du mois de mars pour l'acide syringique, provenant de la firme Sigma, sont bien distinctes du reste du groupe, provoquant le rejet de l'hypothèse de reproductibilité.

Les résultats de l'ANOVA appliquée aux moyennes quadratiques des huit standards diffèrent un peu de ceux de l'ANOVA réalisée sur les coordonnées de l'ACP. En effet, **l'acide syringique** (de la firme aAesar), **l'acide vanillique** et **l'acide gallique** ont des p-valeurs inférieurs à 5% induisant un rejet de l'hypothèse d'égalité. Une comparaison des RMS mesurés au cours des trois mois (*Annexe VIII*) pour un même échantillon permet d'observer que la répétabilité au sein du mois de mai poserait principalement problème pour l'acide syringique (en moyenne deux fois supérieure aux RMS de mars et d'avril) et l'acide gallique (en moyenne 1,5 fois supérieure aux RMS de mars et d'avril), tandis que

dans le cas de l'acide vanillique, une variabilité plus importante est observée au cours du mois d'avril (en moyenne 1,5 fois supérieure aux RMS de mars et de mai).

Afin de comprendre ces résultats, une nouvelle analyse ANOVA a été réalisée sur les variations pour mettre en lumière les différences observées au sein des mois de mars, d'avril et de mai. Le détail de cette analyse est développé ci-dessous. Ceux-ci permettent de mettre en évidence les variations des conditions environnementales, qui pourrait influencer la qualité des spectres.

### 1.2.2.3 REPRODUCTIBILITÉ DES CONDITIONS DE MESURES

Une ANOVA à un facteur, réalisée sur les mêmes données qu'au point 1.2.2.2, a permis de mettre en évidence que la reproductibilité est influencée par les conditions extérieures (Tableau 6). Pour les deux tests, l'hypothèse d'égalité des moyennes est rejetée. Autrement dit, des différences de reproductibilité sont observées durant les mois de mars, avril et mai. Cela s'explique en partie par la variabilité de l'appareil. En effet, les réponses instrumentales mesurées sur un appareil unique peuvent fluctuer en raison de variations de température, de la dérive électronique et des changements de longueur d'onde ou de la stabilité de l'intensité de la source lumineuse (Piers *et al.* 2003). Les spectres peuvent donc varier légèrement d'une mesure à l'autre et d'un jour à l'autre. Ajoutons également que, puisque nous travaillons sur des extraits secs, la vitesse d'évaporation de l'éthanol (influencée par la saturation de l'atmosphère immédiate en éthanol et la température) peut influencer la répartition de l'échantillon sur le cristal et donc la mesure.

**Tableau 6 : p-valeur des ANOVA à un facteur sur l'influence des conditions de mesures**

	<b>SNV + Dérivée 1<sup>ère</sup></b>	<b>RMS</b>
<b>Mars</b>	3,1*10 <sup>-61</sup>	7,8*10 <sup>-4</sup>
<b>Avril</b>	1,8*10 <sup>-65</sup>	0,014
<b>Mai</b>	9,6*10 <sup>-56</sup>	0,003

En tenant compte de ces remarques, nous pouvons accepter l'hypothèse de reproductibilité puisque les tests ANOVA réalisés sur les standards sont concluants, dans sept cas sur huit lorsqu'ils sont appliqués sur les coordonnées selon la première composante d'une ACP, appliquée au spectre MIR traité par SNV et dérivée première, et dans cinq cas sur huit s'ils sont appliqués sur les RMS.

## 2. MÉLANGES D'ACIDES PHÉNOLIQUES

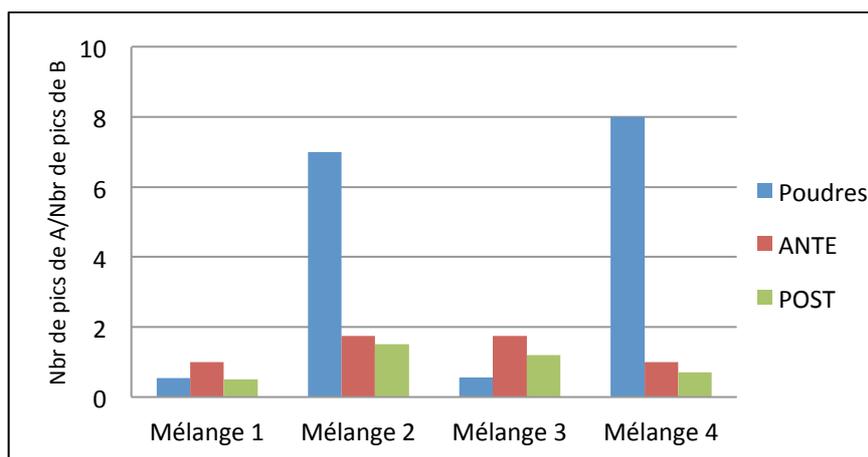
Les mélanges d'acides phénoliques sont des mélanges binaires, où les deux constituants sont présents en quantité égale. Ils ont été préparés sous forme solide et sous forme de solutions. Pour la préparation des solutions, la technique de mise en solution directe du mélange (« Post »), a été réalisée parallèlement à la technique « Solubilisation ante mélange » (« Ante ») qui consiste à solubiliser les standards avant de les mélanger. La composition des mélanges est rappelée dans le Tableau 7.

**Tableau 7 : Composition des mélanges d'acides phénoliques analysés**

	Nom des acides phénoliques	
	A	B
<b>Mélange 1</b>	acide syringique	acide vanillique
<b>Mélange 2</b>	acide syringique	acide gallique
<b>Mélange 3</b>	acide 3,4-dihydroxybenzoïque	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
<b>Mélange 4</b>	acide 3,4-dihydroxybenzoïque	acide 4-hydroxybenzoïque

### 2.1 CHOIX DE LA TECHNIQUE DE PRÉPARATION

Les mélanges peuvent être préparés (techniques « Post » vs « Ante ») et mesurés sous différents états (poudre ou extrait sec). Pour choisir la technique la plus appropriée, nous avons, en premier lieu, essayé d'attribuer à chaque pic du spectre d'un mélange, l'acide phénolique auquel il correspond. Ceci a pour objectif d'estimer la contribution des constituants, au spectre de chaque mélange, par un décomptage du nombre de pics associés à chaque acide phénolique. Cette identification a porté aussi bien sur les mélanges de poudres que sur les solutions appelées « Post » et « Ante ». La Figure 28, montre le ratio entre le nombre de pics associés à chacun des acides phénoliques présents dans le mélange. Le ratio sera égal à 1 lorsque le spectre du mélange contient un nombre équivalent de pics associés au premier et au second polyphénol constitutif du mélange.



**Figure 28 : Contribution des standards au mélange**

Légende : Nbr de pics de X = nombre de pics associés au composé X dans le spectre du mélange. A et B sont spécifiés dans le Tableau 7.

L'interprétation des ratios permet d'éliminer la technique des mélanges solides, comme technique potentielle pour la mesure du profil en composés phénoliques dans une matrice végétale. La Figure 28 nous montre que le rapport, entre le nombre de pics associés aux acides phénoliques A et B n'est pas égal à 1 pour les mélanges sous forme de poudre (en bleu), en comparaison aux mélanges mesurés par la méthode des extraits secs (en rouge et en vert). Par exemple, parmi les seize pics contenus dans le spectre du mélange 2 sous forme de poudre (*Annexe V*), quatorze sont associés à l'acide syringique tandis que deux pics sont caractéristiques de l'acide gallique. Dans ce cas, le mélange 2 à base de poudre obtiendra un ratio égal à sept. La même démarche a été appliquée pour évaluer la composition des spectres des quatre mélanges sous forme solide et liquide.

Contrairement aux poudres, le **recensement des pics** des fingerprint, des spectres de mélanges liquides, montre que les composés A et B présentent un nombre de pics équivalents, reflétant de cette manière la composition des mélanges. La proportion relative des pics associés aux composés de base est donc relativement stable et équilibrée dans le cas des mélanges liquides. Les deux techniques de solubilisation sont équivalentes en ce qui concerne la répartition des composés. La technique « **solubilisation 'post' mélange** » sera conservée car la moyenne de l'ensemble des rapports A sur B est plus proche de 1 que celle de la technique « Ante » (0,98 versus 1,5). De plus, « Post » demande moins de quantité d'échantillons et de temps de préparation. Enfin, cette technique s'identifie à la mise en solution d'extraits végétaux. Elle sera appliquée pour l'identification de composés phénoliques dans une matrice végétale solubilisée dans l'éthanol.

## 2.2 INTERPRÉTATION SPECTRALE

Les pics identifiés dans les spectres mesurés pour les différents mélanges ont été associés à des fonctions chimiques sur base des gammes de nombre d'onde correspondant aux acides phénoliques (Table 4). Les mélanges ont ensuite été caractérisés en fonction de la présence ou l'absence de pics au sein des régions suivantes (Figure 29 et *Annexe V*):

- 1) 1725-1680  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations des liaisons C=O des fonctions acides carboxyliques ;
- 2) 1650-1590  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations des liaisons C=C au sein des aromatiques ;
- 3) 1470-1435  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation asymétrique des liaisons O-CH<sub>3</sub> des groupements méthoxyle ;
- 4) 1410-1310  $\text{cm}^{-1}$ , associée principalement aux vibrations de déformation des liaisons O-H mais aussi aux vibrations d'élongation (combinée) des liaisons C-O des phénols ;
- 5) 1320-1280  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation des liaisons O-H des fonctions acides carboxyliques ;
- 6) 1310-1210  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons R-O-Ar des fonctions éther ;
- 7) 1260-1180  $\text{cm}^{-1}$ , associée principalement aux vibrations d'élongation et de déformation des liaisons C-O mais aussi aux vibrations de déformation des liaisons O-H des phénols ;
- 8) 1225-950  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation, dans le plan, des liaisons C-H des aromatiques ;
- 9) 1190-1075  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O des fonctions acides carboxyliques ;
- 10) 955-915  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation, hors du plan, des liaisons O-H des fonctions acides carboxyliques.

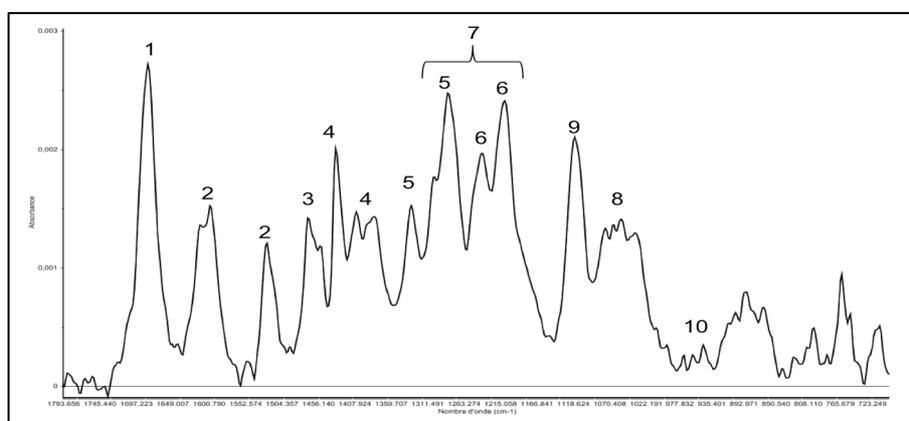
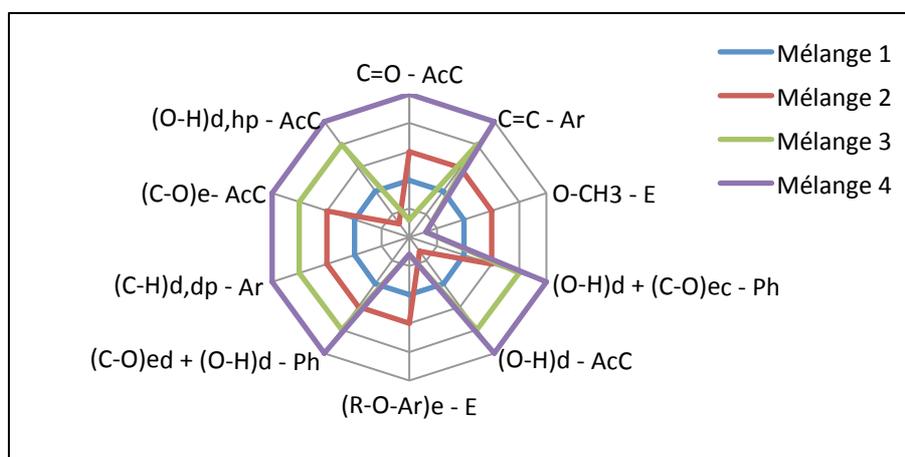


Figure 29 : Spectre MIR du mélange 1 (acide syringique + acide vanillique). Les numéros correspondent aux régions auxquelles sont associées les pics

Pour chaque région, un score de 0,3 ou de x a été attribué à chacun des mélanges selon l'absence ou la présence de pics dans cette région. La valeur x varie de 1 à 4 en fonction du numéro du mélange. En effet, nous n'avons pas accordé le même chiffre aux différents mélanges en cas de présence d'une fonction chimique par souci de clarté de la représentation visuelle des résultats. Ainsi, il est plus facile de visualiser le profil de chaque mélange. La Figure 30 présente le résultat final : l'empreinte associée à chacun des mélanges est différente des autres.

Les mélanges 1 et 2 présentent tous deux des pics dans la région associée aux éthers puisqu'ils contiennent de l'acide syringique qui possède deux groupements méthoxyle. L'acide vanillique présent uniquement dans le mélange 1 possède également un groupement méthoxyle.

Le mélange 1 (en bleu) possède des pics dans toutes les régions précitées et forme donc un décagone régulier. Le mélange 2 (en rouge), par contre, n'absorbe pas dans les régions 5 et 10 associées aux vibrations de la fonction hydroxyle des acides carboxyliques. Le mélange 3 (en vert) n'a pas absorbé dans les régions 1, 3 et 6 correspondant à la liaison C=O des acides carboxyliques et aux fonctions éther. Le mélange 4 (en violet), quant à lui, absorbe dans toutes les régions à l'exception de celles concernant les fonctions éther.



**Figure 30 : Diagramme en radar des mélanges d'acides phénoliques**

Légende : AcC = acide carboxylique ; Ar = cycle aromatique, E=éther, Ph = phénol ; d = déformation ; e = élongation ; c = combinaison ; dp = dans le plan ; hp = hors du plan

### 3. PELURES DE POMMES

Afin d'évaluer la méthode mise au point, nous allons comparer l'empreinte spectrale d'un mélange synthétique, à base de standards de composés phénoliques, à un échantillon de pelures de pommes ainsi qu'à son extrait phénolique. Le mélange synthétique est composé des cinq composés phénoliques présents majoritairement dans la pelure selon l'étude de Khanizadeh (2008).

**Tableau 8 : Composition principale en composés phénoliques de pelure de pommes (valeurs de la littérature<sup>19</sup> et mélange synthétique)**

Composés phénoliques	Proportion dans la pelure de pommes (%TPC)	Concentration dans le mélange synthétique (ppm)
<b>Ac. Chlorogénique</b>	0,13	200
<b>Epicatechine</b>	0,27	400
<b>Quercétine-3-galatoside</b>	0,19	290
<b>Procyanidine B2</b>	0,20	300
<b>Quercétine-3-arabinoside</b>	0,13	200

*Légende : TPC = contenu total en composés phénoliques*

Tout comme pour les mélanges d'acides phénoliques, les pics des spectres mesurés pour les trois types de mélanges (synthétique, extrait de pelures de pommes et extrait phénolique de pelures de pommes) ont été identifiés et associés à des fonctions chimiques sur base du Tableau 4.

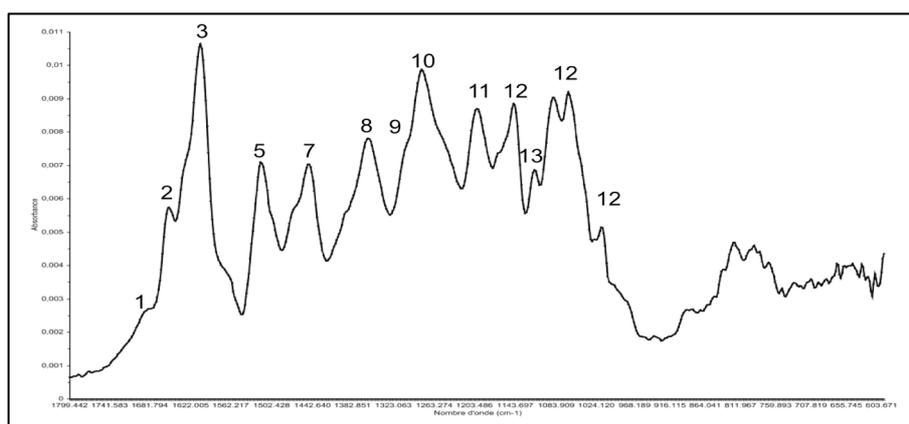
L'échantillon de pomme avec lequel nous avons travaillé correspond à la variété « Genova », qui présente une forte couleur rouge, indicateur d'une présence importante d'anthocyanines. Les anthocyanines ne font pas partie du mélange synthétique car le composé phénolique associé à cette famille dans l'étude de Khanizadeh (la cyanidine-3-galactoside) n'était pas disponible au moment de la préparation du mélange. Pour remédier à cela, les plages spectrales associées aux anthocyanines ont été ajoutées lors de l'identification.

Les types de mélanges ont été comparés en fonction de la présence ou l'absence de pics au sein des régions suivantes (Figure 31 et *Annexe V*) :

- 1) 1725-1680  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations des liaisons C=O des fonctions acides carboxyliques ;
- 2) 1670-1625  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons C=O de la fonction diphénylpropane ;
- 3) 1650-1590  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations des liaisons C=C au sein des aromatiques ;

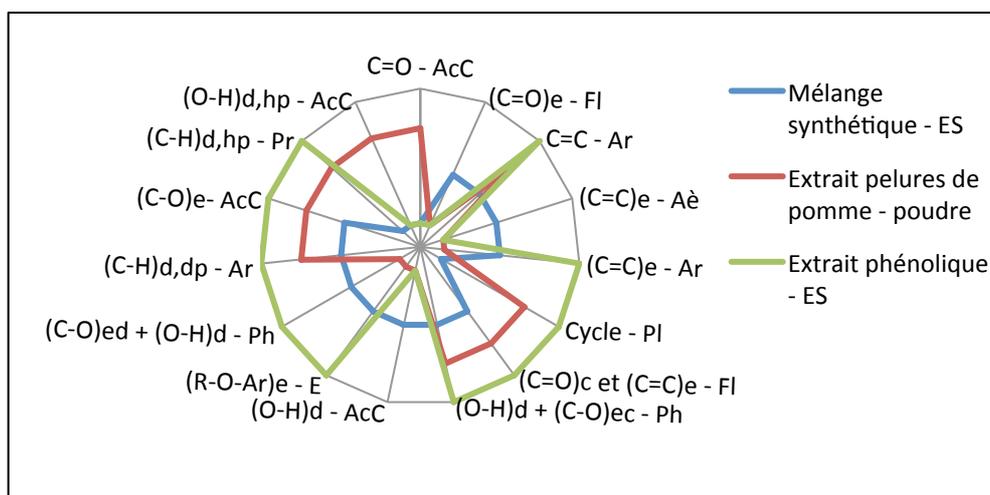
<sup>19</sup> Source : Khanizadeh et al. 2008

- 4) 1640-1610  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons C=C au sein des doubles liaisons carbone ;
- 5) 1525-1480  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons C=C au sein des aromatiques ;
- 6) 1450-1400  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations du noyau pyrylium des anthocyanines ;
- 7) 1420-1400  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations combinées des liaisons C=O mais aussi aux vibrations d'élongation des liaisons C=C des pyranes ;
- 8) 1410-1310  $\text{cm}^{-1}$ , associée principalement aux vibrations de déformation des liaisons O-H mais aussi aux vibrations d'élongation (combinée) des liaisons C-O des phénols ;
- 9) 1320-1280  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation des liaisons O-H des fonctions acides carboxyliques ;
- 10) 1310-1210  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons R-O-Ar des fonctions éther ;
- 11) 1260-1180  $\text{cm}^{-1}$ , associée principalement aux vibrations d'élongation et de déformation des liaisons C-O mais aussi aux vibrations de déformation des liaisons O-H des phénols ;
- 12) 1225-950  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation, dans le plan, des liaisons C-H des fonctions aromatiques ;
- 13) 1190-1075  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O des fonctions acides carboxyliques ;
- 14) 960-900  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation, hors du plan, des liaisons O-H des noyaux pyrylium des anthocyanines ;
- 15) 955-915  $\text{cm}^{-1}$ , associée aux vibrations de déformation, hors du plan, des liaisons O-H des fonctions acides carboxyliques.



**Figure 31 : Spectre MIR du mélange synthétique de pelures de pommes. Les numéros correspondent aux régions auxquelles sont associées les pics**

Pour chaque région un score de 0,3 ou de  $x$  a été attribué aux trois types de mélanges respectivement selon l'absence ou la présence de pics dans cette région. La valeur  $x$  attribuée est de 1, 2 ou 3 respectivement pour le mélange synthétique (mesuré comme extraits secs), la poudre de pelures de pommes ou l'extrait phénolique (mesuré comme extraits secs). La Figure 32 schématise l'empreinte spectrale des différents mélanges.



**Figure 32 : Diagramme en radar du mélange synthétique, de la poudre de pelures de pommes et de son extrait phénolique.**

*Légende : AcC = acide carboxylique ; Aè = alcène ; Ar = cycle aromatique, E=éther ;  
Fl = diphénylpropane ; Pl = pyrylium ; Pn = pyrane ; Ph = phénol ;  
d = déformation ; e = élongation ; c = combinaison ; dp = dans le plan ; hp = hors du plan ;  
ES = extrait sec*

La courbe du **mélange synthétique** (bleu) est bien caractéristique des standards. En effet, les pics dans les régions 9 et 13 accordées aux acides carboxyliques, indiquent la présence d'**acides phénoliques**. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'acides hydroxycinnamiques puisque des pics sont mesurés dans la région associée aux alcènes. Les **flavonoïdes** sont également présents dans le mélange synthétique comme en témoigne la présence des pics d'une part dans les régions 2 et 7 associées à la structure diphénylpropane et d'autre part dans la région 10 représentative des éthers.

Pour rappel, les poudres de **pelures de pommes** sont insolubles dans l'éthanol. C'est donc le spectre des **poudres** de pelures de pommes (rouge) qui a été interprété. Celui-ci présente essentiellement des pics dans les régions associées aux composés phénoliques en général, et donc peu caractéristiques, c'est-à-dire les régions 3, 8 et 12. Nous pouvons supposer la présence d'acides phénoliques par l'expression de pics dans les régions 1, 13 et 15 se rapportant aux acides carboxyliques. Les flavonoïdes, quant à eux, sont identifiés grâce à la teneur élevée de la pomme en **anthocyanines**. Contrairement au mélange

synthétique, le spectre des pelures de pommes n'exprime qu'un pic dans les régions caractéristiques de la structure diphénylpropane (région 7). Cela peut s'expliquer en partie par les effets de matrice induits par la présence des sucres, protéines et autres composés.

Le spectre de l'**extraits phénoliques** de pelures de pommes (en vert), qui est mesuré sous forme d'un extrait sec, reflète la présence **d'acides phénoliques** (pics dans la région 13) et de deux types de **flavonoïdes**. Les pics localisés dans les régions 2 et 7 reflètent la présence de composés à base d'une structure diphénylpropane, tandis que les pics identifiés dans les zones 6 et 14 correspondent à des anthocyanines. L'extraction des composés phénoliques permet donc une meilleure interprétation de la composition phénolique de la matrice végétale. De plus, l'identification des gammes spectrales, capables d'interpréter les mélanges, au moyen des informations contenues dans les principaux standards présents dans la matrice végétale, se révèle probant.

## CONCLUSION

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 est un outil de choix pour la caractérisation de molécules chimiques telles que les composés phénoliques. En effet, les spectres mesurés pour chacun des composés sont spécifiques, cela étant prouvé et mis en avant par leur analyse en ACP. L'analyse chimiométrique des spectres permet de distinguer les différentes familles de composés phénoliques. Ces premiers résultats sont encourageants puisque l'objectif est de parvenir à distinguer ces mêmes familles dans une matrice végétale.

Pour se rapprocher des conditions dans lesquelles évoluent les composés phénoliques, nous avons travaillé sur des solutions préparées à base de standards de composés phénoliques. La méthode des extraits secs (c'est à dire la mesure du résidu phénolique après évaporation du solvant, ici l'éthanol), 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 200 ppm. Les autres paramètres, jugés comme optimaux pour la mesure des spectres, sont : un nombre de scans égal à 64, une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ , la prise d'un nouveau background avant chaque mesure et le dépôt de 80  $\mu\text{l}$  d'échantillon sur le cristal de l'accessoire ATR.

Avant d'étudier des échantillons plus complexes, nous avons validé les hypothèses de répétabilité et de reproductibilité de la méthode. Les solutions testées, à base de standards de composés phénoliques, ne se comportent pas de la même manière face à ces deux hypothèses. Nous pouvons considérer que la technique des extraits secs est répétable comme le confirme l'analyse des RMS (inférieures au standard de référence) et des coefficients de variation (inférieurs à 0,4) des différentes solutions mesurées. Concernant la reproductibilité, nous avons observé des disparités entre les composés. Au delà de la structure chimique, celles-ci peuvent être dues à la stabilité, la cristallisation et la recristallisation des molécules au moment de la mesure. Nous avons également pu mettre en évidence que l'environnement de l'appareil et l'appareil en lui-même sont sources de variabilités, d'autant plus que l'environnement influence directement le processus d'évaporation de l'éthanol et donc la mesure du

spectre des composés solubilisés. Néanmoins, les résultats de l'analyse ANOVA de cinq standards sur huit ont conclu sur le non rejet de l'hypothèse de reproductibilité.

L'analyse et l'interprétation de quatre mélanges de synthèse ont permis d'identifier la méthode optimale de préparation des échantillons et de mettre au point la technique de caractérisation spectrale de ces mélanges. Les solutions ont été analysées après solubilisation : les standards sont pesés et mélangés avant d'être solubilisés dans l'éthanol. Cette méthode présente l'avantage d'être plus proche du modèle des mélanges de composés phénoliques contenus dans les extraits végétaux naturels. Nous avons ensuite choisi d'utiliser les informations, obtenues grâce à la caractérisation des standards à la base des mélanges, pour caractériser ces derniers. En effet, l'analyse des standards a permis de faire un lien entre les régions spectrales et les fonctions chimiques retrouvées dans les composés phénoliques. Sur base de ces régions, nous avons ensuite mené une analyse qualitative de mélanges synthétiques consistant dans un premier temps à s'assurer de l'expression des différents composés phénoliques présents dans le mélange, et dans un second temps à utiliser ces régions spectrales pour comparer quatre mélanges. Cette analyse a permis de discriminer les quatre solutions, pourtant de composition assez proche. Maintenant que la méthode est prête, nous l'avons confronté à l'analyse d'un extrait végétal, à savoir la pelure de pommes.

Sur base des recherches bibliographiques menées, un mélange synthétique de la composition standard d'une pelure de pommes, à partir d'acide chlorogénique, d'épicatéchine, de quercétine-3-galactoside, de procyanidine B2 et de quercétine-3-arabinoside, est réalisé et analysé. En parallèle, des extraits de pelures de pelures de pommes sont analysés directement via le spectromètre tandis que l'extrait phénolique des pelures de pommes est solubilisé dans l'éthanol. Les spectres mesurés sont ensuite interprétés sur base des régions spectrales exprimées par les composés phénoliques présents dans le mélange synthétique. Des régions spectrales, associées aux anthocyanines, ont été ajoutées au moment de l'interprétation car la variété de pomme étudiée, « Genova », présente une forte concentration de ces flavonoïdes. Notre mélange synthétique représente une composition moyenne, car le profil en composés phénoliques présents dans les pommes est fortement influencé 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. Les anthocyanines n'en faisaient pas partie et n'étaient donc pas pris en compte lors de la constitution du mélange modèle du contenu phénolique des pelures de pommes. En ne considérant pas les pics associés aux anthocyanines, le profil de l'extrait phénolique de pelures de pommes colle mieux, que celui des pelures de pommes, au mélange synthétique. En effet, dans l'échantillon de pelures de pommes il y a un effet

matrice important, résultant de la présence de protéines, sucres, etc., qui interfère avec l'identification des composés phénoliques.

En conclusion, l'analyse de l'extrait phénolique de pelures de pommes par un spectromètre MIR muni d'un accessoire ATR, permet d'avoir une première estimation de sa composition en composés phénolique. L'extrait phénolique a été mesuré sous forme d'un extrait sec après une solubilisation, à la concentration de 200 ppm, dans l'éthanol à 96% et les traitements de données spectrales ont été réalisés sur la région du spectre, qui s'étend de 1800 à 700  $\text{cm}^{-1}$ , 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. La mesure du mélange synthétique, comme estimation de la composition moyenne en composés phénoliques de la pelure de pommes, permet de cibler les régions spectrales intéressantes pour la caractérisation de l'extrait de pelures. 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. Pour l'analyse de matrices équivalentes, il ne sera plus nécessaire de préparer des mélanges synthétiques.

Comme perspectives pour ce travail et dans le but d'améliorer la méthode, il serait intéressant de ré-optimiser la technique de mesure de extraits secs en effectuant l'étape d'évaporation de l'éthanol à plusieurs mètres du spectromètre. Ceci permettrait de ne pas saturer l'air environnant l'appareil en éthanol. L'échantillon devrait dans ce cas être déposé sur une microplaque qui n'absorbe pas les IR (par exemple en KBr).

La méthode mise au point permet une étude qualitative du profil en composés phénoliques. L'analyse plus approfondie des spectres, notamment concernant les valeurs d'absorbance, pourrait ouvrir la voie à une analyse quantitative. Lors de l'interprétation des données obtenues pour des mélanges, le rapport entre l'aire des pics et l'aire totale par exemple permettrait une meilleure caractérisation.

Finalement, avant de valider définitivement cette méthode, il convient de la tester sur des échantillons d'autres variétés de pelures de pommes, puis d'extraits végétaux différents. L'utilisation d'outils chimiométriques permettrait sans doute d'affiner les résultats et de développer un modèle mathématique fiable pour l'identification des composés phénoliques.



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



**PUBLICATIONS**

Allison G. G., Thain S. C., Morris P., Morris C., Hawkins S., Hauck B., Barraclough T., Yates N., Shield I., Bridgwater A. V. et Donnison I. S. 2009. Quantification of hydroxycinnamic acids and lignin in perennial forage and energy grasses by Fourier-transform infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Bioresource technology* 100 : 1252-1261

Bauer R. Nieuwoudt H. Bauer F.F., Kossmann J., Koch K.R. et Esbensen K.H. 2008. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry* 80 : 1371-1379

Ceymann M., Arrigani E., Scharer H., Nising A. B. et Hurrell 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

Chen Q., Zhao J., Chaitep S. et Guo Z. 2009. Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* L.) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry* 113 : 1272-1277

Chen Q., Zhao J., Liu M., Cai J. et Liu J. 2008. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 46 : 568-573

Cieslik E., Greda A. et Adamus W. 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food chemistry* 94 : 135-142

Craig A. P., Franca A. S. et Oliveira L. S. 2012. Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees. *Food Chemistry* 132 : 1368-1374

Diel P., Smolnikar K. et Michna H. 1999. In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta medica* 65 : 197-203

Edelmann A., Diewok J., Schuster K. C. et Lendl B. 2001. Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on Mid-infrared spectroscopy of Phenolic wine extracts. *Journal Agriculture Food Chemistry* 49 : 1139-1145

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

Ignat I., Volf I. et Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126 : 1821-1835

Kemsley E.K., Holland J.K., Defernez M. et Wilson R.H. 1996. Detection of adulteration of raspberry purees using infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 : 3864-3870.

Khanizadeh S., Tsao R., Rekika D., Yang R., Charles M. T. et Rupasinghe H. P. V. 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of food composition and analysis* 21 : 396-401

- Lam H., Proctor A., Howart L. et Cho M. 2005. Rapid fruit extracts antioxidant capacity determination by Fourier transform infrared Spectroscopy. *Journal of Food science* 70 : 545-549
- Lu X., Wang J., Al-Qadiri H. M., Ross C. F., Powers J. R., Tang J. et Rasco B. A. 2011. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 129 : 637-644
- Lu Y. et Yeap Foo L. 1996. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry* 59 : 187-194
- Lu Y. et Yeap Foo L. 1999. The polyphénol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 65:1-8
- Mattila P. et Hellström J. 2007. Phenolics acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of food composition and analysis* 20 : 152-160
- Naes T., Isaksson T., Fearn T. et Davies T. 2002. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester.
- Pappas C.S., Takidelli C., Tarantilis P.A et Polissiou M.G. 2009. Quantitative determination of anthocyanins in three sweet cherry varieties using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 : 17-21
- Peirs A., Tirry J, Verlinden B, Darius P et Nicolai B.M. 2003. Effect of biological variability on the robustness of NIR models for soluble solids content of apples. *Postharvest Biology and Technology* 28 : 269-280
- Peng Y., Liu F., Peng Y. et Ye J. 2005. Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food chemistry* 92 : 169-175
- Pinelo M., Manzocca L., Nunez M. et Nicoli M. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry* 88 : 201-207
- Queji M.D., Wosiacki G., Cordeiro G., Peralta-Zamora P. et Nagata N. 2010. Determination of simple sugars, malic acid and total phenolic compounds in apple pomace by infrared spectroscopy and PLSR. *International Journal of Food and Technology* 45 : 602-609
- Raal A., Orav A., Pussa T., Valner C., Malmiste B. et Arak E. 2012. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry* 131 : 632-638
- Schulz H. et Baranska M. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43 : 13-25.
- Siger A., Czubinski J., Kachlicki P., Dwiecki K., Lampart-Szczapa E. et Nogala-Kalucka M. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of food composition and analysis* 25 : 190-197

- Sinelli N., Spinardi A., Di Egidio V., Mignani I. et Casiraghi E. 2008. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 50 : 31-36
- Soriano A., Pérez-Juan P.M., Vicario A., Gonzalez J.M. et Perez-Coello M.S. 2007. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 104 : 1295-1303
- Stehfest K., Boese M., Kerns G, Piry A. et Wilhelm C. 2003. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of plant physiology* 161 : 151-156
- Tsao R. et Yang R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition : Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 1018 : 29-40
- Vardin H., Tay A., Ozen B. et Mauer L. 2008. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry* 108 : 742-748
- Versari A., Parpinello G. P., Scazzina F. et Del Rio D. 2010. Prediction of total antioxidant capacity (TAC) of redwine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control* 21 : 786-789
- Veys P., Baeten V., Berben G., Boix A., Fumière O., Vancutsem J., Von Holst C. (2007). CRL-AP Interlaboratory study 2006 (Final report)
- Williamson G. et Caruhgi A. 2010. Polyphenols content and health benefits of raisins. *Nutrition Research* 30 : 511-519

#### **SITES INTERNET : CITATIONS ET FIGURES**

- CSIM. *De l'acquisition au traitement de données moléculaires*.  
<http://www.csim.cnrs.fr/Chimiometrie.html>. Mai 2012
- LaChimie. *Interferometre IR*.  
<http://www.lachimie.fr/analytique/infrarouge/interferometre.php>. Mars 2012
- Molecular Expressions. *Specular and Diffuse Reflection*. 15 juin 2006.  
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/reflection/specular/index.html>. Avril 2012
- Scrapcoloring. *Diamant*. 2009. <http://scrapcoloring.fr/news/diamant>. Mars 2012
- Tisanes et vieux remèdes. *La sauge*. <http://www.toutes-les-tisanes.com/plantes/sauge.htm>. Mars 2012
- Organisation Mondiale de la santé-Stratégie mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé. *Régime alimentaire, nutrition et prévention des maladies chroniques*. 2004.  
<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/summary/fr/index.html>  
 . Avril 2012
- Organisation Mondiale de la santé-Stratégie mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé. *Promouvoir la consommation de fruits et légumes dans le monde*. 2004. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/fr/index.html>. Avril 2012

Multimania. *Spectroscopie/Infra Rouge*.

<http://membres.multimania.fr/jjww/page233.htm>. Mai 21012

Wikimedia. *Molecular energy levels*. 4 novembre 2009.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Molecular\\_energy\\_levels\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Molecular_energy_levels_en.svg). Mars 2012

### **LIVRES**

Bruice P. Y. 2007. *Organic chemistry 5<sup>th</sup> edition*. Pearsin international Ed. Prentice Hall. 1319 pp

Cheyrier V., Sarni Manchado P. et Quideau S. 2012. *Recent advances in polyphenol research vol. 3*. Wiley-Blackwell Ed. 384 pp

Conseil supérieur de la santé. 2009. *Recommandations nutritionnelles pour la Belgique*. n°8309, Bruxelles : conseil supérieur de la santé. 110 pp

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

*Le petit Larousse illustré 2007*. Paris : Larousse. 1855 pp

### **AUTRES**

Collin S. 2010. *LBAL2103- Chimie des denrées alimentaires : Note de cours*. Earth and life institute, UCL

Govaerts B. 2011. *LBIRC2106 - Chimiométrie : Note de cours*. Institut de Statistique, UCL

The Unscrambler® X 10.1. 2011. CAMO software, Oslo Norvège

# ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
ATR	Attenued Total Reflectance
CRA-W	Centre wallon de Recherches agronomiques
DRIFT	Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform [spectroscopy]
ES	Extraits Secs
FT-IR	Fourier Transform InfraRed [spectroscopy]
IR	Infrarouge
MIR	Moyen Infrarouge
PIR	Proche Infrarouge
PLS	Partial Least Square [regression]
RMS	Root Mean Square
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross-Validation
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
SIMCA	Soft Independent Modeling of Class Analogy
SNV	Standard Normal Variate
TAC	Total Antioxidant Capacity
TPC	Total Polyphenol Content

\* Voir définitions dans l'Annexe IX



# ANNEXES

---

Annexe I : Structure chimique des 40 composés phénoliques analysés

Annexe II : Spectres (fingerprint) des 40 composés phénoliques analysés

Annexe III : Métabolisation et biosynthèse des composés phénoliques

Annexe IV : Optimisation et développement de la méthode sur l'acide gallique

Annexe V : Spectres des mélanges

Annexe VI : Interprétation spectrale des composés phénoliques et des mélanges

Annexe VII : Représentations graphiques des analyses en composantes principales

Annexe VIII : Traitements statistiques

Annexe IX : Définitions