

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Merci à mon promoteur, Vincent Baeten, non seulement pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire au CRA-W mais aussi pour sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens à remercier Cathy Debier, pour avoir accepté sans hésitation d'être ma co-promotrice.

Merci à Christine Dupont, d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

Je voudrais également remercier Philippe, pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Merci pour la disponibilité, les précieux conseils et pour l'aide que vous m'avez apportés. Je vous suis très reconnaissante.

Merci à Pascal, pour sa disponibilité et ses conseils. Vous avez « presque » réussi à me réconcilier avec la biologie végétale.

Merci également à Ouissam, Juan, Damien et Nicaise pour leur aide précieuse lors du traitement des données.

Je remercie Marie, Benoit, Nicaise et Quentin pour m'avoir fait une place dans leur labo et pour leur bonne humeur au quotidien. Merci plus particulièrement à Benoit et Quentin pour m'avoir guidée tout au long de la partie pratique de ce mémoire.

Merci à toute l'équipe du CRA-W ainsi qu'à tous les stagiaires de l'unité 15 pour la bonne humeur et les petites attentions qui font du bien. Vous avez égayé mes journées.

Un grand merci à Josefine « mon ange gardien » pour toute l'aide que tu m'as apportée. Je te suis tellement reconnaissante.

Je tiens à remercier mes ami(e)s, en particulier ma meilleure amie Dona, pour son soutien indéfectible tout au long de ces années d'étude.

Mille mercis à mes parents, Emilienne et Eric, pour leur soutien et leur encouragement. Vous êtes des parents exceptionnels. J'espère vous garder le plus longtemps à mes côtés pour vous le rendre au centuple. Un grand merci à mon frère, Brice, pour son soutien ainsi qu'à tous les membres de ma grande et formidable famille.

Enfin, le plus important, je dédie ce travail de fin d'étude à ma tante Olga qui se bat contre le cancer et à ma source d'inspiration, ma grand-mère Delphine partie trop tôt.

RESUME

De nos jours, l'une des méthodes couramment utilisées pour le contrôle qualité des denrées alimentaires à destination humaine et animale est l'analyse par spectroscopie proche infrarouge (SPIR). La SPIR permet en effet une analyse rapide, à faible coût et ne nécessite pas ou très peu de préparation de l'échantillon. De nombreuses études ont déjà été réalisées en SPIR, en microscopie proche infrarouge (NIRM) ou en imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI) pour la détection des contaminants dans les aliments à destination humaine et animale.

L'objectif de ce mémoire est d'explorer les méthodes analytiques rapides, SPIR, NIRM et NIR-HSI pour la détection et la quantification de particules d'ergot dans les farines de céréales. De plus, les possibilités offertes par la microscopie optique, qui est la méthode de référence pour la détection de contaminants, ont également été étudiées. Quatre types d'échantillons ont été analysés : un set de farines du commerce de différentes céréales, un set de sclérotés d'ergots broyés de différentes sources, des mélanges farine-ergot avec des teneurs en ergot de 1 % à 50 % et enfin, un set de farines adultérées en ergot provenant d'Arvalis, avec des teneurs en ergot de 0 à 2,6 % qui correspondent à des concentrations en alcaloïdes de 10 ppm à 57884 ppm.

L'analyse exploratoire en composante principale (ACP) a permis de discriminer les poudres d'ergot des farines de céréales par SPIR, NIRM et NIR-HSI avec une limite en termes de qualité d'information pour la SPIR. Les modèles de discrimination développés sur base des spectres moyens en SPIR, NIRM et NIR-HSI confirment la possibilité de classer les échantillons d'ergot et de farines de céréales avec une sensibilité et une spécificité de 100 % pour la SPIR et le NIRM et autour de 90 % pour le NIR-HSI.

Les modèles de discrimination développés sur base des spectres moyens en SPIR sur le set d'échantillons Arvalis, classe ces échantillons comme non adultérés. Par contre les modèles de discrimination NIRM et NIR-HSI appliqués point par point sur les mappings NIRM et pixel par pixel sur les images NIR-HSI des 2 sets d'échantillons farine-ergot et Arvalis montrent qu'il est possible dans les échantillons de mélanges, de détecter des particules identifiées comme ergot. Cet aspect est le principal avantage des méthodes NIRM et NIR-HSI par rapport à la SPIR qui ne permet pas dans un mélange adultéré en ergot, de détecter des particules comme ergot. La quantification de l'ergot réalisée en NIRM sur les spectres par particules permet d'obtenir des valeurs prédites similaires aux valeurs de référence avec un coefficient de détermination proche de 0,98. Les modèles d'étalonnages réalisés sur les spectres moyens des mélanges, en NIRM et NIR-HSI montrent qu'une quantification du mélange farine-ergot avec une teneur en ergot de 1 % en NIRM est faisable. La quantification pour les mélanges Arvalis en NIRM et pour les deux types de mélange en NIR-HSI n'a pas été concluante. Quant à la microscopie optique, la coloration au rouge soudan couplée à l'analyse en fond clair permet de détecter l'ergot dans les farines.

Cette étude présente le potentiel de la microscopie et de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée à la chimiométrie pour proposer une solution analytique et ouvre des perspectives pour la détection de particules de contaminant dans les farines.

Mots-clés : contaminant, ergot, alcaloïdes, farines, méthodes analytiques

ABSTRACT

Nowadays, classical near infrared spectroscopy (NIR) is commonly used as a tool for the quality control of foodstuff. NIR allows rapid, low cost analysis and requires only a few steps of sample preparation. Several studies have already been carried out using NIR, near infrared microscopy (NIRM) or, near infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) for the detection of contaminants in food and feed.

The objective of this master thesis is to explore rapid analytical methods, SPIR, NIRM and NIR-HSI for the detection and quantification of ergot particles in cereals flours. Moreover, the possibilities offered by optical microscopy, which is the reference method for the detection of contaminants, were also studied. Four types of samples were analyzed : one set of different cereals flours, another set with ergots sclerotia from several sources and two set of mixtures : flours with 1 % to 50 % of ergot content and Arvalis's flours with 0 % to 2,6 % of ergot content corresponding to 10 ppm to 57884 ppm alkaloids.

Principal component analysis (PCA) has shown that it is possible to discriminate ergot from cereals flours by using NIR, NIRM and NIR-HSI. The results of discriminant models developed in SPIR, NIRM and NIR-HSI, based on mean spectra demonstrated the possibility, to classify ergot and flours samples with 100 % specificity and sensibility for SPIR and NIRM and around 90 % for NIR-HSI. SPIR discriminants models did not reveal ergot content in Arvalis samples. While, NIRM and NIR-HSI discriminants models applied point by point on NIRM's mapping and pixel by pixel on NIR-HSI's imaging showed detection of particles identified as pure ergot in the 2 sets of mixture. The NIRM quantification at particle level, based on percentage of spectra predicted as ergot in mixture, was not convincing and a quite good value for the determination coefficient (0,98) was calculated. The calibration models based on mean spectra mixture revealed that it is possible to quantify flour-ergot mixture with 1 % of ergot content by NIRM method. Unfortunately, results of quantification obtained on Arvalis samples with low level of ergot were not satisfactory. The results of NIR-HSI calibration model were not exploitables.

Concerning optical microscopy, sudan red dye paired with bright field and polarized light has shown that detection of ergot in cereals flours is possible.

This study exposed the potential of microscopy and hyperspectral imaging near infrared combined with chemometrics tools to suggest analytical methods and to open future for detection of contaminants particles in flours.

Keywords : contaminants, ergot, alkaloids, flours, analytical methods

TABLE DES MATIERES

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	x
I. Introduction.....	1
II. Revue de la littérature.....	3
1. Les céréales.....	3
1.1 Définition	3
1.2 Le grain	3
1.3 Composition des céréales.....	3
1.3.1 Orge.....	3
1.3.2 Avoine	3
1.3.3 Riz	4
1.3.4 Seigle.....	4
1.3.5 Sarrasin.....	4
1.3.6 Quinoa	5
1.3.7 Blé	5
1.4 La farine	6
2. Les contaminants des céréales	6
2.1 Quelques maladies des céréales	7
2.1.1. « Stinking smut (bunt) and Dwarf bunt » la carie du blé	7
2.1.2 « Semi-loose smut and covered smut » Le charbon nu du blé.....	8
2.1.3 L'ergotisme	8
2.2. Le cycle de l'ergot.....	8
2.3 Les alcaloïdes de l'ergot	9
2.3.1 Voie de biosynthèse des alcaloïdes	11
2.3.2 Les effets néfastes des alcaloïdes d'ergot	11
3. Réglementation	12
4. Les méthodes d'analyse	13
4.1 Méthodes de détection de l'ergot	13
4.1.1 Détection visuelle	13
4.1.2 Méthode immuno-enzymatique (ELISA)	13
4.2 Méthodes de détection des alcaloïdes de l'ergot.....	14

4.2.1	Chromatographie sur couche mince	14
4.2.2	Chromatographie liquide et détection en spectrométrie de masse (LC-MS)	14
4.2.3	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	14
4.3	La microscopie optique	15
4.3.1	Principe de fonctionnement	15
4.3.2	Quelques utilisations de la lumière	16
4.3.2.1	Microscopie à fond clair	16
4.3.2.2	Microscopie à polarisation	16
5.	Les méthodes infrarouges	17
5.1	Historique	17
5.2	La spectroscopie	17
5.2.1	Généralités	17
5.2.2	Régions spectrales d'intérêt analytique	17
5.3	La spectroscopie infrarouge	19
5.3.1	Le rayonnement électromagnétique	19
5.3.2	Développement des modèles vibrationnels	19
5.3.2.1	Oscillateur harmonique	20
5.3.2.2	Oscillateur anharmonique	21
5.3.2.3	Les molécules polyatomiques	22
5.3.3	Principe de fonctionnement et appareillage	24
5.3.3.1	Instrumentation	25
5.3.3.1.1	Sources lumineuses	25
5.3.3.1.2	Séparateurs de longueurs d'onde	26
5.3.3.1.3	Détecteurs	28
5.4	la microscopie proche infrarouge (NIRM)	29
5.4.1	Principe de fonctionnement	29
5.5	Imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI)	30
5.5.1	Principe de fonctionnement	30
6.	Applications	32
7.	Chimiométrie	34
7.1	La méthode exploratoire	34
7.1.1	L'analyse en composante principale (ACP)	34
7.2	Les méthodes prédictives	35
7.2.1	Régression linéaire	35
7.2.2	Discrimination	35
III.	Matériel et méthode	37

1. Description des échantillons	37
2. Analyse par spectroscopie proche infrarouge (SPIR).....	42
2.1 Appareillage	42
2.2 Mode opératoire	42
3. Analyse par microscopie proche infrarouge (NIRM).....	44
3.1 Appareillage	44
3.2 Choix du mode d'analyse.....	45
3.3 Mode opératoire	46
4. Description de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI)	47
4.1 Appareillage	47
7.3 Mode opératoire	47
5. Analyse par microscopie optique	49
5.1 Appareillage	49
5.2 Mode opératoire	50
6. Méthodologie du traitement de données	51
6.1 Prétraitement des données spectrales	51
6.2 Création des librairies -calibration-validation- validation croisée	52
6.3 Modèle de discrimination (PLS-DA).....	52
6.4 Modèle de calibration (PLS)	53
IV. Résultats et discussion	55
1. Analyse par spectroscopie proche infrarouge (SPIR).....	55
1.1 Résultats	55
1.1.1 Spectres des échantillons.....	55
1.1.2 Analyse exploratoire.....	56
1.1.2 Modèle de classification.....	61
1.2 Discussion	63
2. Analyse par microscopie proche infrarouge (NIRM).....	63
2.1 Résultats	63
2.1.1 Spectres moyens des échantillons	63
2.1.2 Analyse exploratoire.....	65
2.1.3 Modèle de classification.....	71
2.1.4 Modèles de calibration	78
2.1.5 Analyse exploratoire du son	80
2.2 Discussion	81
3. Analyse par imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI).....	81

3.1 Résultats	81
3.1.1 Spectres moyens des échantillons	81
3.1.2 Analyse exploratoire.....	82
3.1.3 Modèle de classification	82
3.1.4 Modèle de calibration	84
3.2 Discussion	85
3.3 Comparaison des résultats des méthodes infrarouge	85
4. Analyse par microscopie optique	86
4.1 Résultats	87
4.1.1 Analyse farine blanche - ergot pur	87
4.1.2 Analyse de la farine complète	89
7.4 Discussion	91
V. Conclusions et perspectives.....	93
VI. Références bibliographiques	96
VII. Annexes	a

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du grain de céréale	3
Figure 2: Structure de l'ergoline	10
Figure 3: Structure de l'acide lysergique, de l'ergine et de l'ergonovine	10
Figure 4: Configuration du microscope à lumière polarisée	16
Figure 5: Portion du spectre électromagnétique présentant un intérêt pour les applications analytique	18
Figure 6: Représentation de l'oscillateur harmonique	20
Figure 7 : Modèle simple d'une molécule diatomique : les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k	20
Figure 8 : Représentation de l'oscillateur anharmonique.....	21
Figure 9 : Les différents modes de vibrations d'une molécule triatomique.....	23
Figure 10 : Les différents modes d'analyse en spectroscopie infrarouge	25
Figure 11: Principe de la spectroscopie	25
Figure 12: Principe d'un interféromètre de Michelson (spectromètre à transformée de Fourier)	27
Figure 13: Trajet optique du faisceau IR dans la partie microscope	30
Figure 14: Représentation des trois dimensions d'un hypercube	31
Figure 15 : Echantillons de farine du supermarché.....	37
Figure 16: Trois échantillons de sclérote	39
Figure 17 : Six poudres d'ergot pur de trois sources à deux granulométries	39
Figure 18 : Dispositif de tamisage	39
Figure 19 : Instrument de broyage	39
Figure 20 : Treize échantillons adultérés en ergot fournis par Arvalis	41
Figure 21 : Instrument de spectrométrie proche infrarouge (Foss XDS)	42
Figure 22 : Coupelle contenant un échantillon de farine adultéré en ergot.....	43
Figure 23 : Coupelle introduite dans la fenêtre de mesure pour l'analyse	44
Figure 24 : Microscope infrarouge Bruker Hypérion 3000 installé au CRA-W.....	45
Figure 25 : Echantillon de farine blanche disposé sur un verre en quartz prêt pour l'analyse	46
Figure 26 : Imagerie hyperspectrale proche infrarouge Burgermetrics line scan	48
Figure 27 : Disposition d'un échantillon de mélange farine -alcaloïdes sur le téflon.....	48
Figure 28 : L'échantillon de mélange farine-alcaloïdes prêt pour l'analyse en NIR-HSI	49
Figure 29 : Instrument de microscopie optique ZEISS	50
Figure 30 : Spectres proche infrarouge acquis avec le FOSS XDS	55
Figure 31 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 30 échantillons obtenus avec le FOSS XDS..	56
Figure 32 : Loadings PC1/PC2, de l'analyse en composante principale réalisée sur les spectres de 30 échantillons obtenus avec le FOSS XDS.....	60
Figure 33 : Spectres proche infrarouge acquis avec le Foss XDS.....	61
Figure 34 : Valeur prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » réalisé avec le set de spectres acquis avec le FOSS XDS.	62

Figure 35 : Spectres moyens en microscopie proche infrarouge acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.....	64
Figure 36 : Spectres moyens des mélanges farine-ergot pur en microscopie proche infrarouge acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.	65
Figure 37 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres moyens de 37 échantillons acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.....	65
Figure 38 : Loadings PC1/PC2, de l'analyse en composante principale réalisée sur les spectres moyens de 37 échantillons obtenus avec le Bruker Hypériorion 3000.	67
Figure 39 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 37 échantillons acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.	69
Figure 40 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 37 échantillons acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.....	70
Figure 41 : Valeurs prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » réalisé sur les spectres moyens acquis avec le Bruker Hypériorion 3000.....	72
Figure 42 : Modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux farines de céréales.....	73
Figure 43 : Valeurs prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux mélanges farine-ergot.....	74
Figure 44 : Modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux farines adultérées en ergot fournies par Arvalis avec des teneurs en ergot de 0 % à 2,60 % dont les concentrations en alcaloïdes sont de 10 ppm à 57884 ppm.	76
Figure 45 : Corrélation entre valeurs de références du pourcentage d'ergot et valeurs prédites par le modèle PLS-DA « Ergot Vs Farines » appliqué aux mélanges farine-ergot et farine adultérées en ergot (Arvalis).....	77
Figure 46 : Prédiction de l'échantillon avec une teneur en ergot de 1 % d'ergot.....	78
Figure 47 : Prédiction des échantillons avec une teneur en ergot de 1,27 % (28272 ppm) et 2,60 % (57884 ppm).....	79
Figure 48 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de son, de farine blanche, de farine semi complète et de farine complète acquis avec le Bruker Hypériorion 3000. é.....	80
Figure 49 : Mélange farine blanche-ergot pur coloré au soudan rouge.	87
Figure 50 : Grossissement de la structure d'hyphe issue du mélange farine blanche-ergot pur observée en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel).....	88
Figure 51 : Grossissement de la structure d'hyphe issue du mélange farine blanche-ergot pur observée en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel).....	89
Figure 52 : Farine complète colorée au rouge soudan.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Poids et valeurs des éléments nutritifs des parties comestibles de l'avoine	4
Tableau 2 : Tableau comparatif des farines	5
Tableau 3 : Degrés de liberté et modes normaux de vibration	23
Tableau 4 : Composition chimique des farines de céréales du supermarché	38
Tableau 5 : Volume du mélange farine-ergot	40
Tableau 6 : Echantillons analysés par les différentes méthodes en proche infrarouge	41
Tableau 7 : Comparaison des paramètres d'analyse des méthodes infrarouges	49
Tableau 8 : Caractéristiques des bandes spectrales mises en évidence lors de l'analyse PCA	59
Tableau 9 : Caractéristique des bandes spectrales mises en évidence lors de l'analyse PCA	68
Tableau 10 : Table de confusion validation croisée	72
Tableau 11 : Table de confusion de validation croisée	73
Tableau 12 : Table de confusion validation croisée.....	83

I. INTRODUCTION

L'ergot, *claviceps purpurea* est un champignon qui parasite les céréales telles que le seigle et le blé. Le sclérote qui est la forme de conservation de l'ergot remplace physiquement la graine produite par la plante. L'ergot produit des toxines appelées alcaloïdes qui sont à l'origine de l'ergotisme. Au moyen-âge, l'ergotisme était à l'origine de nombreux décès. Les principaux symptômes se manifestent sous formes de membres gangréneux et de convulsions. A ce jour, les intoxications que l'on rencontre chez l'Homme sont principalement iatrogènes, c'est-à-dire liées à un surdosage de médicament lors des traitements de migraine (Cacoub *et al.*, 2005).

Malgré sa rareté chez l'Homme, l'intoxication aux alcaloïdes de l'ergot reste une préoccupation majeure pour le bétail. En effet, dans de nombreux pays, lorsque le grain est contaminé par l'ergot, il est enlevé de la chaîne alimentaire humaine. Ce grain est dirigé vers l'alimentation animale avec des limites de concentration beaucoup plus souples que celles de l'alimentation humaine (Schumann, 2000). Cela est principalement dû au fait que l'on considère à tort le bétail moins sensible aux alcaloïdes d'ergot que l'Homme (Shelby, 1999 cité par Coufal-Majewski *et al.*, 2016). Or, la contamination du grain par l'ergot peut avoir des effets néfastes pour le bétail, notamment des problèmes de croissance et de reproduction. De plus, on peut observer une perte de rendement céréalier jusqu'à 10 % (Murray *et al.*, 2008). Il va sans dire que c'est un problème majeur pour l'agriculture. Par ailleurs, la réglementation sur la limite de concentration en ergot pour l'alimentation animale n'est pas universelle. En effet, au sein de l'Union Européenne, la limite est de 0,1 % (Directive, 2002), au Royaume Uni de 0,001 % et aux Etats-Unis de 0,3 % (Coufal-Majewski *et al.*, 2016). Pour l'alimentation humaine, le problème de la non universalité de la réglementation se pose aussi. Toutefois, la limite de concentration en ergot est beaucoup plus drastique. Par ailleurs, aucune réglementation sur la limite de concentration en alcaloïdes d'ergot n'a encore été établie.

A l'heure actuelle, il est possible de détecter les sclérotés d'ergot par la méthode de détection visuelle. Elle s'appuie sur la différence de forme et de couleur entre les sclérotés noirs et le grain de blé. Cette méthode d'analyse est néanmoins fastidieuse et requiert un temps considérable. D'où l'intérêt de développer des techniques d'analyse rapides et non destructives telles que les méthodes infrarouges. D'ailleurs, une étude menée par Vermeulen *et al.*, (2012) a montré qu'il est possible de détecter et quantifier les sclérotés d'ergot dans les céréales selon

les limites fixées par la législation Européenne, par spectroscopie proche infrarouge (NIR) et imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI) (Vermeulen *et al.*, 2012).

Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur la détection et la quantification de l'ergot dans les farines de céréales par NIR, par microscopie proche infrarouge (NIRM) ou par NIR-HSI.

Ce travail a pour premier objectif de développer une méthode basée sur la spectrométrie proche infrarouge pour la détection et la quantification de l'ergot dans les farines de céréales. Pour ce faire, des modèles de classification et d'étalonnage en NIR, NIRM et NIR-HSI ont été développés. Les performances des différentes méthodes ont été évaluées et comparées, afin de déterminer la plus apte à répondre à cet objectif.

Le deuxième objectif est d'explorer les possibilités d'analyses en microscopie optique qui permettraient la détection de l'ergot dans les farines de céréales. La coloration au rouge soudan des échantillons couplée à l'analyse en fond clair et en lumière polarisée a été évaluée.

La première partie de ce travail présente des généralités sur les céréales et leurs contaminants, la réglementation en vigueur, les méthodes d'analyse qui permettent la détection de l'ergot et des alcaloïdes, les principes des méthodes infrarouge et de chimiométrie utilisés dans ce travail.

La deuxième partie décrit les échantillons utilisés ainsi que les quatre instruments de mesure et leur mode opératoire : NIR (Foss XDS), NIRM (Bruker Hypérion 3000), NIR-HSI (Burgermetrics line scan) et le microscope optique ZEISS.

La troisième partie présente les résultats obtenus avec les différentes méthodes, les discussions associées et une comparaison des performances des méthodes infrarouge utilisées.

La dernière partie apporte une conclusion générale et quelques suggestions en guise de perspectives pour approfondir davantage ce travail.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. LES CÉRÉALES

1.1 Définition

Nom donné aux graminées et à certaines plantes d'autres familles, cultivées pour leurs grains, qui servent à la nourriture de l'Homme et des animaux domestiques¹.

1.2 Le grain

Il est constitué de trois parties : le germe, composé d'huiles et de vitamines. L'endosperme, qui est riche en hydrates de carbone et en protéines. Le son, qui permet l'apport en fibres, vitamines, minéraux et en composés phénoliques photochimiques (Liangli et al., 2012).

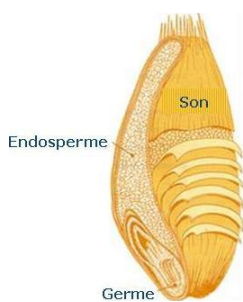


Figure 1: Structure du grain de céréale²

1.3 Composition des céréales

1.3.1 Orge

L'orge est de nos jours particulièrement utilisée dans l'industrie de la bière. Elle était autrefois consommée comme aliment de base. Cette céréale est riche en protéines, hydrates de carbone et fibres alimentaires (Liangli et al., 2012). L'endosperme de l'orge est constitué principalement de β glucane, notamment connu pour réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de diabète (Pins et Kaur, 2006).

1.3.2 Avoine

La culture de l'avoine d'antan était destinée aux aliments pour le bétail.

¹ <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/c%C3%A9r%C3%A9ales/14245>

² <http://www.eufic.org/article/fr/expid/cereales-completes/>

La découverte des effets bénéfiques de cette céréale pour l'homme a permis de l'introduire sous différentes formes pour l'alimentation humaine en Europe. Elle est riche en β -glucane, arabinoxylane et en cellulose (Jing et Hu, 2012). Le **tableau 1** présente les éléments nutritifs de l'avoine.

Tableau 1 : Poids et valeurs des éléments nutritifs des parties comestibles de l'avoine

Principaux éléments nutritifs	Unités	Valeur pour 100 grammes
Eau	g	8,22
Protéines	g	16,89
Lipides totaux	g	6,90
Carbohydrates	g	66,27
Fibres	g	10,6

(USDA NUTRIENT database cité par Liangli et *al.*, 2012)

1.3.3 Riz

La moitié de la population mondiale consomme cette céréale comme aliment principal. Le riz est particulièrement riche en hydrates de carbone et en protéines mais contient très peu de lipides. Cette composition est observée chez toutes espèces de riz confondues (Boa, 2012).

1.3.4 Seigle

Le grain de seigle est une bonne source d'hydrates de carbone, vitamines, minéraux et de certains composés phytochimiques (Luthria et *al.*, 2012).

1.3.5 Sarrasin

Le sarrasin est composé de 65-75 % d'amidon (Li and Zhang, 2001). La teneur en protéine varie de 8,5 à 18,87 %. Les proportions en protéines sont supérieures à celles retrouvées entre autres dans le riz et le blé, mais elles sont inférieures à celles de l'avoine (Krkošková and Mrazova, 2005).

1.3.6 Quinoa

Le quinoa est une pseudo-céréale composée d'environ 14 % de protéines. C'est au sein de la structure embryonnaire que la concentration en protéines est la plus importante. La teneur en lipides pour cette pseudo-céréale est de 9,7 %. La teneur en amidon est de 51,6 % et celle en fibres alimentaires est de 11 % (Ruales, 1992).

1.3.7 Blé

Le blé fait partie des céréales les plus cultivées au monde. On distingue plusieurs types de blé, à savoir : *triticum durum* (blé dur), *triticum aestivum* (blé tendre) et *triticum monococcum* (engrain). Cette céréale est très riche en amidon, environ 70 % de sa composition en matière sèche. Elle est aussi composée de 10 à 15 % de protéines que l'on retrouve dans tous les tissus mais, en proportion plus importante au niveau du germe et de la couche aleurone (Debiton, 2010). L'épeautre est une sous-espèce du blé tendre, avec une faible teneur en lipides mais des concentrations plus importantes en protéines et fibres alimentaires (Biacs et al., 2002).

³Tableau 2 : Tableau comparatif des farines

Principaux éléments nutritifs	Orge	Avoine	Riz (blanc)	Seigle	Sarrasin	⁴ Quinoa	Blé tendre ou froment T 55
Protéines (g)	/	16,89	6,61	9,39	13,25	16,5	11,7
Lipides (g)	/	6,90	0,58	1,77	3,4	6,3	0,8
Glucides (g)	/	66,3	79,34	77,49	71,5	69	69,3
Eau (g)	/	8,22	12,89	9,85	9,75	/	13,9

³ [http://uses.plantnet-project.org/fr/Avena_sativa_\(PROTA\)](http://uses.plantnet-project.org/fr/Avena_sativa_(PROTA)) <http://www.lanutrition.fr/fraliment/fraliment/3904-riz-blanc-grain-moyen-sec.html>

<http://www.lanutrition.fr/fraliment/fraliment/3860-farine-de-seigle.html>

<http://www.lanutrition.fr/fraliment/fraliment/3917-sarrasin.html>

<http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/fr/> (cite kozio (1992)

<http://informationsnutritionnelles.fr/farine-de-ble-tendre-ou-froment-t55>

(USDA NUTRIENT database cité par Liangli et al., 2012)

⁴ (Kozio, 1992)

1.4 La farine

⁵La farine est une poudre issue du broyage de céréales ou de certaines légumineuses à l'aide d'une meule à grain ou d'un moulin. Les caractéristiques d'une farine sont déterminées par son taux d'extraction et son taux de blutage. Le taux d'extraction renseigne sur la proportion de farine obtenue pour 100 kg de grains. On dira, par exemple, qu'une farine est extraite à 90 % lorsqu'on obtient avec 100 kg de grains, 90 kg de farine. On note par ailleurs que plus ce taux est élevé, moins la farine sera considérée comme étant pure. Le taux de blutage donne le pourcentage de matière éliminée durant le processus de fabrication de la farine.

2. LES CONTAMINANTS DES CEREALES

Dans la littérature, les mycotoxines sont les contaminants les plus souvent cités pour les céréales. Le taux d'humidité inférieur à 12% requis pour le stockage des céréales, favorisant ainsi le développement des moisissures, pourrait expliquer en partie la prépondérance des mycotoxines comme contaminant des céréales. Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'Homme et des animaux. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels dans de nombreuses denrées d'origine végétale. Notamment, les céréales, ainsi que les aliments manufacturés ou composés destinés à l'alimentation humaine et animale. Les mycotoxines sont secrétées par des moisissures appartenant aux genres tels que : *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Fusarium* (GALTIER *et al.*, 2006).

Deux groupes de champignons toxinogènes peuvent être distingués. Le premier type est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur plantes sénescents ou stressées : il est alors question de toxines de champs. L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte, on les qualifie de toxines de stockage. On distingue parmi les groupes considérés importants du point de vue agroalimentaire et sanitaire, les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone, les trichothécènes et notamment le déoxynivalénol et la toxine T-2 (GALTIER *et al.*, 2006). Les mycotoxines qui vont nous intéresser dans ce mémoire appartiennent au genre *claviceps*, en particulier le

⁵ <https://toxikoa.files.wordpress.com/2011/02/analyse-de-la-farine-et-produits-de-ble.docx>

champignon *Claviceps purpurea*, dont le terme « purpurea » provient de sa capacité à remplacer le noyau du grain d'origine par un sclérote qui contient plusieurs types d'alcaloïdes (Krska and Crews, 2008). Une étude menée par Kang et al., (2010) a permis d'isoler et de caractériser un nouvel alcaloïde, l'oryzadine des tissus de riz noir (Kang et al., 2010).

Au cours de la période de stockage des céréales, d'autres contaminants vont apparaître, notamment les insectes, à savoir, les charançons et les teignes mais aussi les rongeurs : le rat noir, rat brun et la souris commune (De Groot, 2004).

2.1 Quelques maladies des céréales

Trois facteurs sont à l'origine des maladies rencontrées chez les plantes céréalières (Murray et al., 2008):

- L'environnement et le climat favorables au développement de la maladie.
- Le pathogène : bactérie, virus, champignon.
- L'hôte : l'Homme, les animaux ou les deux.

2.1.1. « Stinking smut (bunt) and Dwarf bunt » la carie du blé

Les champignons *Tilletia controversa* et *Tilletia tritici* sont à l'origine de ces maladies. Ces champignons diffèrent très peu entre eux, ce qui rend difficile une discrimination à l'œil nu. La première maladie touche le blé d'hiver, on la retrouve un peu partout. La seconde maladie est présente notamment dans les zones du globe sujet à des périodes de neiges prolongées, comme au Canada et aux Etats-Unis (Murray et al., 2008).

La maladie « Stinking smut » est caractérisée par une forte odeur liée à la présence de triméthylamine et de composés organiques. Cette odeur est un signal de la contamination du noyau. La manifestation des symptômes se fait après le stade d'élongation de la tige. Ces affections vont causer des pertes économiques : rendements céréaliers moins élevés, une perte en termes de qualité du grain et enfin, de faibles prix de vente à cause de l'odeur désagréable du grain. Toutefois, il existe des systèmes qui permettent de limiter l'impact de ces champignons. Un contrôle chimique du « stinking bunt » permet par le biais des composés tels que la carboxine, certains benzimidazole et le difenoconazole de traiter le grain. Pour maîtriser le « dwarf bunt » il faut faire des semis peu profonds et limiter la compaction des sols (Murray et al., 2008).

2.1.2 « Semi-loose smut and covered smut » Le charbon nu du blé

L'avoine et l'orge sont particulièrement touchées par le « semi loose smut » tandis que le type « covered smut », plus répandu aux USA et au Canada, aura un spectre d'infection plus large. Il contamine en effet, non seulement l'avoine et l'orge mais aussi le seigle et l'herbe sauvage. Il existe des systèmes pour contrôler ces maladies, dont notamment un traitement des semences à la carboxine systémique fongicide, particulièrement efficace en traitement primaire des grains (Murray *et al.*, 2008).

2.1.3 L'ergotisme

L'ergotisme est une épidémie que l'on a beaucoup rencontrée au Moyen Age, due à la consommation de pain de seigle contaminé par le champignon *claviceps purpurea* pendant la saison humide. Ce champignon a la particularité de produire de l'ergot au sein des épis. La préparation du pain était capitale pour éviter l'épidémie. En effet, lorsque le pain était préparé sans un tri au préalable, pour enlever les sclérotés noirs, l'ergotisme se manifestait au sein de la population, plus particulièrement chez les pauvres, car ce sont eux qui consommaient du seigle pendant les périodes de famines. Au plus les périodes de famines étaient marquées, au plus les cas d'ergotisme décuplaient. Cette maladie se caractérise par des membres gangréneux, un dysfonctionnement du système nerveux central et enfin, dans les cas les plus graves, par la mort (van Dongen and de Groot, 1995).

L'ergotisme est une maladie causée par les alcaloïdes d'ergot (Belser-Ehrlich *et al.*, 2013). Ce sont diverses molécules de bases azotées qui sont toxiques pour l'Homme et les animaux, après ingestion au-delà d'un certain seuil. Cette maladie est plus rare de nos jours au sein de la population, néanmoins, cela reste une préoccupation majeure. Notamment, dans de nombreux pays où, lorsque le grain est contaminé par l'ergot, il est enlevé de la chaîne alimentaire de l'Homme. Ce grain est dirigé vers l'alimentation animale avec des limites de concentration beaucoup plus souples que celles de l'alimentation humaine (Schumann, 2000). Cela est principalement dû au fait que l'on considère à tort le bétail moins sensible aux alcaloïdes d'ergot que l'homme (Shelby, 1999 cité par Coufal-Majewski *et al.*, 2016).

2.2. Le cycle de l'ergot

Deux stades caractérisent le cycle de vie de l'ergot : la germination et le miellat (Nicholson *et al.*, 2007 cité par Coufal-Majewski *et al.*, 2016).

La germination de l'ergot diffère du processus classique de germination. En effet, dans le cas de l'ergot, il ne se rapporte pas au stade de développement de la graine à la plante, mais plutôt à une fructification en forme de pilon qui pousse à partir du sclérote. On obtient par la suite des ascospores qui vont infecter les ovaires de céréales à fleurs. Les têtes de grains peuvent être infectées par plusieurs sclérotés. Ces derniers vont recourir à diverses périodes d'incubation pour la germination (Nicholson *et al.*, 2007 cité par Coufal-Majewski *et al.*, 2016).

Dans le cadre de notre étude, ce sont les sclérotés de *claviceps purpurea* qui vont nous intéresser plus particulièrement. Une période de 4 à 8 semaines entre 0-10 °C permet l'initiation à la germination. La germination est prolongée avec des températures supérieures à 25°C (Mitchell and Cooke, 1968). La température optimale de ce processus pour l'ergot de seigle se situe entre 18-20°C. La germination peut s'effectuer sans la période de refroidissement, mais, la formation du corps d'ergot est favorable par temps frais et humide. Cette tendance est d'autant plus observée pendant la floraison (Kirchhoff, 1929 cité par Coufal-Majewski *et al.*, 2016).

Le deuxième stade est le **miellat**, lié au durcissement de l'ovaire infecté qui sera remplacé par l'ergot. Cet ergot contaminera par la suite le champ ou le grain récolté ("Ergot of Cereals and Grasses | Disease," n.d.).

2.3 Les alcaloïdes de l'ergot

On trouve des alcaloïdes indoliques dans les champignons du genre *claviceps* mais aussi dans des graines des plantes de la famille des *convolvulaceae* par exemple les dérivés de l'ergoline (Jean, 2009). Les composés des alcaloïdes indoliques sont par exemple, Agroclavine qui est obtenu par condensation du tryptophane, des unités de mévalonates et des cyclisations (Manske and Holmes, 2014). Les alcaloïdes de l'ergot sont dérivés d'un noyau tétracyclique octahydroindoloquinoléique appelé ergoline **figure 2** (ou d'un système de 3 cycles ouvert entre N-6 et C-7). La quantité d'alcaloïdes contenue dans un sclérote peut varier de 0,01 à 0,5 % (Corniere, 2014).

⁶Six alcaloïdes sont prépondérants dans le sclérote : l'ergotamine, l'ergométrine, l'ergocristine, l'ergosine, l'ergocornine et l'ergocryptine (Evans et al., 2004 cité par Coufal-Majewski et al., 2016).

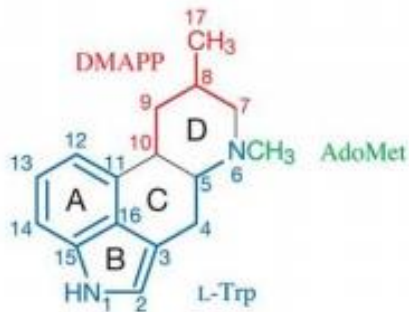


Figure 2: Structure de l'ergoline (Cornière, 2014)

On classe couramment les alcaloïdes de l'ergot en trois catégories : les clavines, les dérivés lysergiques simples et les ergopeptines. Les ergolines peuvent être substituées en C8, le plus souvent par un groupement méthyl ou un hydroxyméthyle. Les 8-ergolènes, où le substituant en C8 peut être un méthyl (ex : agroclavine) ou un carboxyle. Les 9-ergolènes, auxquels sont rattachés les principaux alcaloïdes de l'ergot de seigle (Corniere, 2014).

Ils peuvent avoir une structure d'acides aminés (ex : ergométrine), de peptide à motif cyclolol (ergopeptines) ou de peptide sans motif cyclolol (ergopeptames). Les ergopeptines constituent le groupe le plus complexe : le groupement amide en C17 est substitué par un dérivé tri-peptide. Parmi les plus connus, on peut citer l'ergotamine, l'ergovaline et le dihydroergotamine (Corniere, 2014).

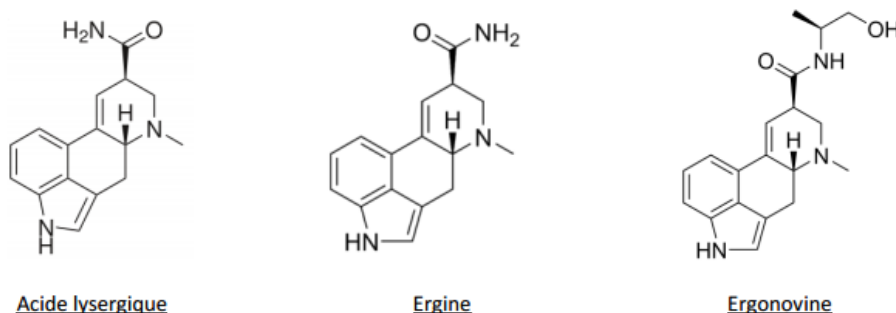


Figure 3: Structure de l'acide lysergique, de l'ergine et de l'ergonovine (Corniere, 2014)

Le groupe acide carboxylique en position 17 caractérise l'acide lysergique. Parmi les dérivés lysergiques simples, on peut citer l'ergine (ou amide de l'acide lysergique) et l'ergonovine (ou ergométrine) (Corniere, 2014).

2.3.1 Voie de biosynthèse des alcaloïdes

Les alcaloïdes de base sont constitués d'amines qui proviennent de nombreux acides aminés ; la phénylalanine, la tyrosine, l'histidine, le tryptophane, la lysine, l'ornithine et l'acide antranilique. Ils sont obtenus par des réactions de décarboxylation, de méthylation, d'hydroxylation et l'addition d'autres groupes. On retrouve au sein de leur structure un cycle aromatique. Ces structures simples d'alcaloïdes vont être déterminantes pour la synthèse de structures plus complexes (Manske and Holmes, 2014). Dans la graine⁷, on retrouve les alcaloïdes au niveau du tégument.

2.3.2 Les effets néfastes des alcaloïdes d'ergot

Il est de plus en plus rare de rencontrer des cas d'ergotisme au sein de la population, cela est en grande partie dû aux progrès technologiques réalisés au niveau du traitement du grain pour l'alimentation humaine mais aussi à grâce à une législation drastique (Coufal-Majewski *et al.*, 2016). On peut observer une perte de rendement céréalier jusqu'à 10% en cas de contamination à l'ergot (Murray *et al.*, 2008).

Le type d'alcaloïde et la concentration sont des paramètres qui vont jouer un rôle important sur la période au cours de laquelle les symptômes liés à une intoxication à l'ergot pourront être observés. Ce temps est variable, il peut être de quelques heures à plusieurs mois (Belser-Ehrlich *et al.*, 2013). Une difficulté supplémentaire réside dans le fait que l'ergotisme présente des symptômes similaires à d'autres maladies telles que les maladies respiratoires, la pourriture des pieds et les engelures (Carlson, 2011). Cela rend le diagnostic plus complexe. La contamination du grain par l'ergot peut avoir de nombreuses conséquences pour le bétail à différents niveaux : son alimentation, sa croissance et sa reproduction. A cela s'ajoutent des facteurs tels que l'âge de l'animal, l'espèce considérée, la durée d'exposition à la toxine et le climat. Ces caractéristiques vont accentuer l'effet négatif des alcaloïdes d'ergot (Schumann *et al.*, 2008).

Une étude réalisée par Burfening, (1994) a montré que lorsque les céréales destinées à l'alimentation bovine sont contaminées par l'ergot à hauteur de 1.6% soit 12.7g ergot ingéré /jour, on observe un apport nutritif beaucoup plus faible pour ces bovins, en comparaison à ceux

⁷ <http://www.lecomprime.com/cours/files/2013/09/Pharmacognosie-chap-3-alcaloides.pdf>

dont l'alimentation ne présente pas une contamination à l'ergot. Toutefois, il a été remarqué que les proportions en ergot inférieures à 12.7g/ jour avaient un impact négligeable sur l'apport nutritif de ces animaux. Cette étude a mis en évidence le fait qu'il faille un apport de 12.7g/jour d'ergot au minimum, pour un effet notable au niveau nutritif des bovins. De plus, [Burfening, \(1994\)](#) a observé lors de cette étude, une diminution du taux de croissance lorsqu'il y a un apport en ergot de 0 à 12,7g/jour. Il existe une relation entre le taux de croissance et la quantité d'ergot ingérée, plus cet apport est important plus le taux de croissance observé est faible ([Burfening,1994](#)).

Une autre étude menée par [Zeilmaker and Carlsen,\(1962\)](#) chez le rat met en évidence le problème d'absence de lait dans les mamelles dû à une ingestion d'alcaloïdes de l'ergot. La prolactine qui est une protéine importante pour les mammifères, notamment pour ses différentes contributions, à savoir : la croissance des glandes mammaires, la stimulation de la synthèse du lait et un effet libidinal. Ils ont remarqué une corrélation entre la diminution de cette protéine et l'inhibition de la production de lait. La chute de la prolactine observée est induite par l'ingestion d'ergocornine. Cet effet est réversible pour autant que l'on apporte des doses continues en prolactine ([Zeilmaker and Carlsen, 1962](#)).

3. REGLEMENTATION

Les limites acceptables pour la concentration en alcaloïdes du bétail sont un point encore controversé. En effet, plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour établir la toxicité des alcaloïdes de l'ergot, à savoir : la toxicité de chaque alcaloïde et les interactions pouvant exister avec les autres mycotoxines présentes dans les aliments à destination animale. La limite au sein de l'Union Européenne de l'ergot pour le blé dur et tendre pour l'alimentation humaine est de 0.05 % soit 500 mg de sclérotés par kg de blé ([Directive, 2002](#)). Cependant, aucune teneur maximale n'est spécifiée pour les alcaloïdes de l'ergot ([Beuerle et al., 2012](#)). Une teneur maximale en sclérotés de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*) de 1000 mg/kg a été établie pour l'alimentation animale contenant des céréales non moulues ([Directive, 2002](#)).

Les recommandations de la commission Européenne sur la surveillance de la présence d'alcaloïdes de l'ergot dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires sont les suivantes : ([2012/154/UE](#))

- Les États membres devraient surveiller, avec le concours actif des exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale, la présence

d'alcaloïdes de l'ergot dans les céréales et les produits à base de céréales destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, dans les pâturages et herbes fourragères destinés à l'alimentation des animaux, dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux composés.

- Il est nécessaire de recueillir davantage de données sur la présence de ces alcaloïdes de l'ergot, non seulement dans les céréales non moulues, mais aussi dans les produits à base de céréales ainsi que les denrées alimentaires et les aliments pour animaux composés. Il importe, en outre, de collecter des données fiables sur la répartition des alcaloïdes de l'ergot dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et d'établir un lien entre la présence d'alcaloïdes de l'ergot et la quantité de sclérotés présents. Il convient d'axer cette surveillance sur les six alcaloïdes de l'ergot les plus courants, à savoir l'ergométrine, l'ergotamine, l'ergosine, l'ergocristine, l'ergocryptine l'ergocornine et leurs dérivés -inines.
- Pour que la relation entre la teneur en sclérotés et les concentrations des différents alcaloïdes de l'ergot soit mieux connue, les États membres devraient si possible déterminer simultanément la teneur en sclérotés de l'échantillon.

4. LES METHODES D'ANALYSE

Plusieurs méthodes permettent la détection de l'ergot et des alcaloïdes.

4.1 Méthodes de détection de l'ergot

4.1.1 Détection visuelle

La détection visuelle de l'ergot est basée sur la différence de la forme (taille) entre les sclérotés noirs et le grain de céréale. La longueur du sclérote est dix fois plus importante que celle du grain (Coufal-Majewski *et al.*, 2016). La taille du sclérote est variable et peut, dans certains cas, être plus petite que celle du grain. Lorsqu'on se trouve dans ce cas de figure, la discrimination du sclérote au sein des grains de céréales se complique (Cowan et Blakley, 2014 cité par (Coufal-Majewski *et al.*, 2016).

4.1.2 Méthode immuno-enzymatique (ELISA)

La méthode ELISA permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée. Cette dernière est induite par un substrat lié au préalable à une enzyme.

Le substrat peut être la phosphatase alcaline ou plus couramment, la glucose oxydase pour identifier des petites quantités de la substance cible (Chaumont, 2014). L'antigène va se lier spécifiquement à un anticorps qui sera lui-même fixé à un autre anticorps. Le complexe obtenu est révélé par une substance fluorogène (Gan and Patel, 2013). ELISA est utile pour l'étude des projections d'ergot de seigle au sein des cultures. Cependant, elle peine encore à déterminer un marqueur de toxine qui pourrait servir de standard pour couvrir un large spectre de la contamination des alcaloïdes (Schnitzius et al., 2001).

4.2 Méthodes de détection des alcaloïdes de l'ergot

4.2.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince permet l'identification du composé désiré, présent dans un mélange. On s'appuie essentiellement sur les propriétés de solubilité qui vont permettre la migration des composés à différents endroits sur une plaque de silice. Cette méthode sépare difficilement les douze principaux alcaloïdes de l'ergot de seigle simultanément (Lobo et al., 1981). Toutefois, elle pourrait être pratique pour l'étude des alcaloïdes pris séparément (Krska and Crews, 2008).

4.2.2 Chromatographie liquide et détection en spectrométrie de masse (LC-MS)

⁸La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permet l'analyse des alcaloïdes dans différentes matrices alimentaires. L'avantage de cette technique est de permettre la détection de tous les alcaloïdes connus en une fois, grâce aux étapes suivantes : extraction par un solvant, séparation, détection et quantification (Krska and Crews, 2008). Elle permet aussi de vérifier la structure et d'identifier des alcaloïdes inconnus, bien que très peu d'études ont été faites à ce sujet (Krska and Crews, 2008).

4.2.3 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les composés à séparer seront mis dans un solvant et le mélange que l'on obtient est ensuite placé dans une phase mobile. On aura une interaction plus ou moins forte de nos molécules avec la phase stationnaire au sein de la colonne chromatographique. Cette interaction est

⁸ <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/24e>

fonction de la nature des molécules. La phase mobile va parcourir le système chromatographique grâce à une pompe sous haute pression (Collin, 2014).

On observera après injection dans le système chromatographique, une distribution de nos composés basée sur leur affinité soit pour la phase mobile soit pour la phase stationnaire. Un détecteur est placé à la sortie de la colonne, il permettra d'attribuer à chaque composé un pic, l'ensemble des pics obtenus est représenté par un chromatogramme (Collin, 2014). Cette méthode permet de détecter les alcaloïdes de l'ergot, plus précisément : l'ergométrine, l'ergotamine, l'ergocornine, l'ergocryptine, ergocristine, ergosine ainsi que leurs épimères (Mainka et al., 2005). La particularité de cette méthode d'analyse est son seuil de détection très bas, de l'ordre de 0.02-1.2 µg/kg lorsqu'on fait un couplage LC-MS/MS (Krska and Crews, 2008).

4.3 La microscopie optique

4.3.1 Principe de fonctionnement

Dans un microscope photonique en transmission, la lumière focalisée traverse l'échantillon. Les lentilles de l'objectif permettent un premier grossissement (entre x5 et x100) puis la lentille de l'oculaire apporte un deuxième grossissement (en général x10). L'agrandissement final correspond au produit des deux grossissements des deux systèmes de lentilles (Morsomme, 2014).

La qualité de l'image dépend du pouvoir de résolution du microscope qui est en grande partie liée à la qualité des lentilles grossissantes, à la longueur d'onde de la lumière (0,4µm - 0,7µm) et à l'ouverture numérique. La limite de résolution du microscope standard est de 0,22 µm, ce qui permet au final un agrandissement possible de 1 000 fois sans perte de qualité. Selon la théorie d'Abbe, la limite de résolution (transverse) d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, peut être exprimée simplement à l'aide de la longueur d'onde d'illumination, de l'indice de réfraction en sortie d'objectif, et du demi angle du cône de lumière maximum accessible (Morsomme, 2014).

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

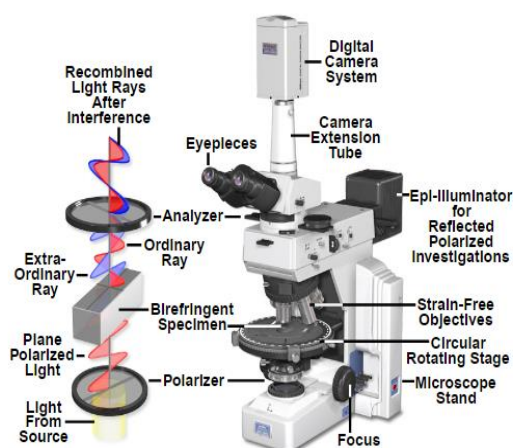
4.3.2 Quelques utilisations de la lumière

4.3.2.1 Microscopie à fond clair

Sous le microscope, de fines coupes de tissus ou des cellules isolées sont examinées par transmission directe de la lumière à travers l'échantillon. Très peu de cellules sont visibles avec le microscope photonique si elles ne sont pas colorées. Des techniques de préparation ont donc été mises au point pour rendre visibles les cellules ou leurs structures internes. La microscopie à fond clair permet d'observer des préparations colorées ou des objets d'amplitude (Morsomme, 2014).

4.3.2.2 Microscopie à polarisation⁹

L'analyse en lumière polarisée est une technique d'amélioration du contraste. Elle permet une meilleure qualité de l'image obtenue avec des matériaux biréfringents lorsqu'on les compare à d'autres techniques telles que le fond clair par exemple. Le microscope à lumière polarisée est conçu pour observer et photographier les spécimens qui sont visibles principalement en raison de leur caractère optiquement anisotrope. Pour accomplir cette tâche, le microscope doit être équipé d'un polariseur, placé dans la trajectoire de la lumière quelque part avant l'échantillon, et un analyseur (un second polariseur), placé dans le chemin optique entre l'ouverture arrière de l'objectif et les tubes d'observation ou le port de la caméra **figure 4**. Le contraste de l'image résulte de l'interaction de la lumière polarisée dans le plan d'un échantillon biréfringent (ou doublement réfringent) pour produire deux composantes d'onde individuelle qui sont polarisées dans des plans perpendiculaires.



¹⁰ Figure 4: Configuration du microscope à lumière polarisée

⁹ <http://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light>

¹⁰ <http://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy>

5. LES METHODES INFRAROUGES

5.1 Historique

¹¹En 1800, William Herschel découvre l'infrarouge grâce à une expérience au cours de laquelle il va scinder la lumière du soleil en arc-en-ciel grâce à un prisme. Au cours de son expérience, il place des thermomètres au niveau des zones de couleurs visibles et invisibles. Suite à cela, il remarque une gradation de chaleur, même au-delà de la zone de couleur visible. Il en conclut qu'il existe un rayonnement invisible (l'infrarouge) capable de transporter l'énergie.

5.2 La spectroscopie

5.2.1 Généralités

La spectroscopie est définie comme l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. Elle peut être divisée en deux grandes classes. La spectroscopie photonique qui repose sur l'étude de l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. Cette classe regroupe essentiellement les méthodes permettant un contrôle rapide. La deuxième classe, à savoir, la spectroscopie des particules, regroupe les méthodes dont l'étude porte soit sur des fragments de molécules ionisés, soit sur le rapport masse/charge de molécules (Bertrand, 2000).

5.2.2 Régions spectrales d'intérêt analytique

Les radiations électromagnétiques, dont la lumière visible représente une toute petite partie, se présentent sous forme d'ondes qui se propagent à partir d'une source, et qui se déplacent en ligne droite, sauf si elles sont réfractées ou réfléchies.

¹¹ <http://herschel.cesr.fr/ExperienceHerschelMain.html>

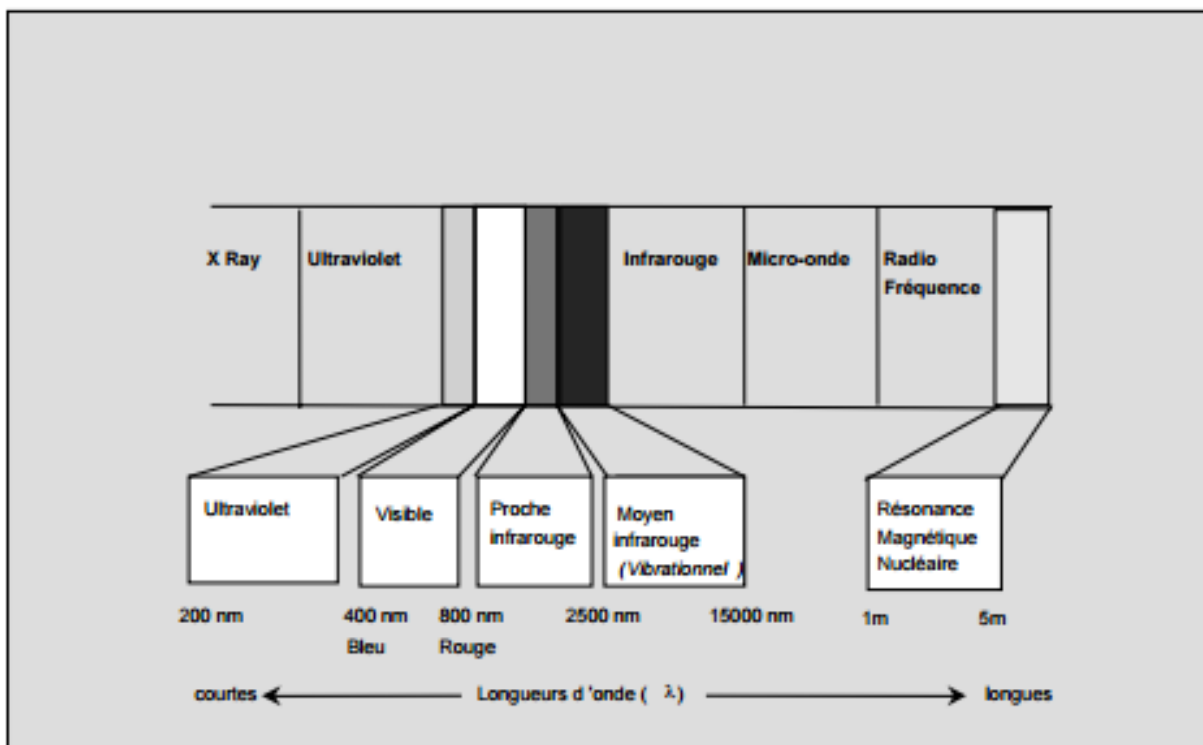


Figure 5: Portion du spectre électromagnétique présentant un intérêt pour les applications analytique (Bertrand and Dufour, 2006).

La région des rayons X (0.05-10 nm) met en jeu les transitions énergétiques des couches internes des atomes et des molécules. L'ultraviolet lointain (10-200 nm) représente la plage de l'émission électronique à partir des orbitales de valence et peut être utilisé en spectroscopie photoélectronique. Dans l'ultraviolet proche (200-400 nm), on observe les transitions électroniques des niveaux énergétiques des orbitales de valence. Cette plage est d'intérêt particulier pour l'analyse des molécules insaturées. Le visible (400-800 nm) est également une plage spectrale où se produisent des transitions électroniques. Dans cette plage, on peut caractériser de nombreuses molécules qui présentent des doubles liaisons conjuguées (Bertrand, 2000). Le visible a une grande importance pratique pour la caractérisation de la couleur des denrées alimentaires. Le proche infrarouge ou PIR (800-2500 nm) est la première plage spectrale en relation avec les vibrations des molécules. Il présente un grand intérêt pratique pour les applications analytiques dans l'agroalimentaire. Le moyen infrarouge ou MIR (2500-25000 nm) est la région principale de la spectroscopie vibrationnelle. Cette plage spectrale est particulièrement bien adaptée à l'identification des composés organiques et à l'étude de la conformation des molécules. Dans la région des micro-ondes (100 μ m-1 cm), l'énergie absorbée est liée à la rotation des molécules. Elle peut être exploitée pour étudier les milieux aqueux hétérogènes et pour le dosage de l'eau dans les aliments (Bertrand, 2000).

La région de la fréquence radio (1 cm-10mètres) est le siège de la résonance magnétique nucléaire(RMN) et de la résonance électronique de spin (Bertrand, 2000).

5.3 La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie dans l'infrarouge (proche et moyen) est probablement, par le nombre et la diversité de ses applications analytiques, la méthode physique la mieux adaptée à l'analyse et à la caractérisation des produits agroalimentaires. Sur le plan fondamental, une raison de son efficacité provient de la nature de l'information spectrale qu'elle permet d'acquérir. Elle porte en effet sur les vibrations des liaisons chimiques des composés organiques. Ces vibrations sont, par principe spécifiques aux groupements chimiques (Bertrand, 2000).

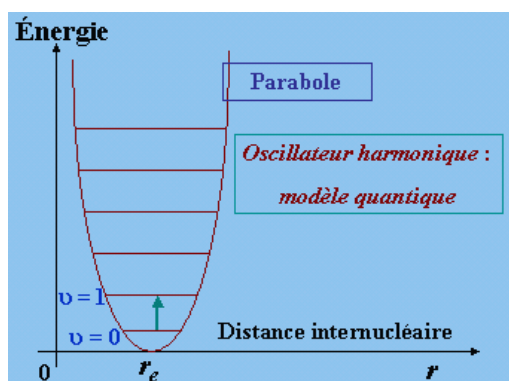
5.3.1 Le rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique est un transfert d'énergie. Il peut être caractérisé par C , la vitesse de propagation ($C = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$), par λ , la longueur d'onde en nanomètre (qui définit la distance effectuée par une onde au cours d'un cycle entier) et par ν , la fréquence en Hertz (qui renseigne sur le nombre de cycles réalisés par seconde). Ces trois paramètres sont liés par la relation suivante : $\lambda = C/\nu$. Le nombre d'onde est défini comme étant l'inverse de la longueur d'onde. ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$ en cm^{-1}). L'énergie du rayonnement électromagnétique est liée à sa longueur d'onde et à sa fréquence par : $E = hc/\lambda = h \nu$. h est la constante de Planck égale à 6.6268×10^{-34} Joules seconde (Bertrand, 2000).

5.3.2 Développement des modèles vibrationnels

Les vibrations moléculaires conduisent à des absorptions dans la région de l'infrarouge. Un cas de vibration simple est celui de la molécule diatomique. La démarche la plus simple consiste à partir de modèles mécaniques simples et à les rendre plus complexes pour tenir compte de l'apport de la mécanique quantique. Le modèle mécanique le plus simple est celui de l'oscillateur harmonique **figure 6** et le modèle légèrement complexe est celui de l'oscillateur anharmonique **figure 7** (Lachenal, 2000).

5.3.2.1 L'oscillateur harmonique



¹²Figure 6: Représentation de l'oscillateur harmonique

Représentation idéale de l'énergie de liaison en fonction de la distance interatomique. Dans ce modèle, la molécule a une énergie non nulle et les niveaux d'énergie sont bien déterminés. C'est une représentation peu complexe qui nous informe sur la position des bandes fondamentales et la force des liaisons avec l'inconvénient de ne pas être le reflet de la molécule réelle. Dans cette représentation, les liaisons sont considérées comme étant parfaitement élastiques, ce qui n'est pas le cas en réalité (Lachenal, 2000).

On considère une particule à deux masses **figure7** ; m_1 et m_2 liées par un ressort dont le déplacement est fonction de la position d'équilibre r_0 . On a K , la constante de force, qui reflète la raideur du ressort, q , la position de la particule définie par l'expression suivante : $q=r-r_0$. Si q satisfait la loi de Hooke, on peut déterminer l'expression de la force qui s'exerce sur la particule (Lachenal, 2000).

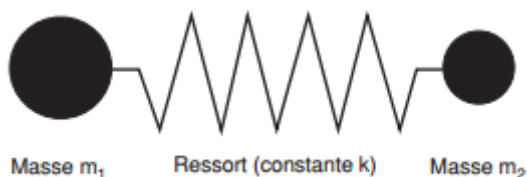


Figure 7 : Modèle simple d'une molécule diatomique : les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k (Bertrand, 2002).

$$F = -k(r - r_0) = -kq$$

¹² Source : http://www.uqac.ca/chimie_ens/Chimie_theorique/Chapitres/chap_4.htm

On va définir μ , comme étant la masse réduite des deux atomes.

$$\mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2}$$

La fréquence de l'oscillateur harmonique exprimée en Hertz ou en s^{-1} est définie par l'expression suivante :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}}$$

Avec K la constante de force et μ la masse réduite

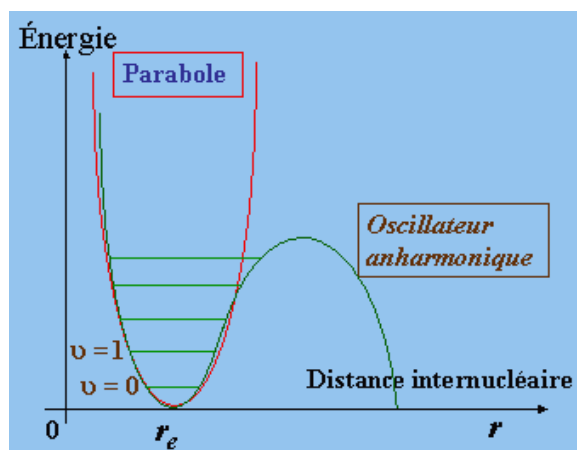
L'expression de l'énergie de vibration E_v déterminée à partir de la résolution de l'équation de Schrödinger est la suivante :

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

Avec V le nombre quantique de vibration, h la constante de Planck et ν_h fréquence de vibration.

A noter que l'application du modèle harmonique est limitée aux très faibles déplacements des atomes (Lachenal, 2000).

5.3.2.2 Oscillateur anharmonique



¹³Figure 8 : Représentation de l'oscillateur anharmonique

¹³ Source : http://www.uqac.ca/chimie_ens/Chimie_theorique/Chapitres/chap_4.htm

Les liaisons atomiques ne suivent pas exactement les lois décrites par le modèle harmonique. Par exemple, si la liaison est très fortement comprimée, l'énergie augmente plus que ce que prévoit la loi de Hooke (Bertrand, 2002).

Au contraire, si la liaison est étirée, la force de liaison tend à diminuer jusqu'à un point auquel la molécule se dissocie en libérant ses atomes constitutifs (Bertrand, 2002). Plusieurs équations ont été développées pour établir le modèle de l'oscillateur anharmonique **figure 8**, notamment, le potentiel de Morse qui permet, à partir d'une équation empirique, de suivre avec une bonne approximation la courbe d'énergie potentielle (Lachenal, 2000).

- Potentiel de Morse

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

α est la constante caractéristique de la liaison entre les atomes et D_e l'énergie de dissociation exprimée en Joules. La solution de l'équation de Schrödinger à partir du potentiel de Morse conduit à l'expression suivante pour l'énergie de vibration en Joules :

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

X_e est la constante d'anharmonicité dont la valeur est petite et positive, ν_a la fréquence d'oscillation anharmonique. Il est important de noter que l'expression de l'énergie de vibration peut être obtenue par des équations autres que celle de Morse, plus rigoureuses, mais elles nécessitent l'ajout des constantes d'anharmonicité y_e , z_e , avec des termes qui ont des exposants supérieurs au deuxième degré, utiles lorsque l'étude porte sur des bandes harmoniques (Lachenal, 2000).

5.3.2.3 Les molécules polyatomiques

- Degrés de liberté

Lorsqu'une molécule est constituée de N atomes, chaque atome peut être repéré à l'aide de ses coordonnées cartésiennes (x , y , z). La molécule possède donc au total $3N$ coordonnées caractéristiques ou $3N$ degrés de liberté. Si ces coordonnées étaient fixes, la molécule serait figée, la longueur des liaisons et les angles de valence seraient également constants. Mais, une molécule peut se déplacer ou se déformer dans l'espace. Il est donc utile de diviser les degrés de liberté en trois groupes : la translation, la vibration et la rotation (Lachenal, 2000).

Tableau 3 : Degrés de liberté et modes normaux de vibration (Herent, 2015)

N atomes	DDL	Translation	Rotation	Vibration
Molécule linéaire	3N	3	2	3N-5
Molécule non linéaire	3N	3	3	3N-6

DDL= Degré De Liberté. Pour une molécule linéaire, on aura trois degrés de liberté pour la translation, deux degrés de liberté pour la rotation et $3N-5$ pour la vibration fondamentale. Les molécules non linéaires auront trois degrés de liberté pour la translation et la rotation, $3N-6$ degrés de liberté pour les vibrations fondamentales (Herent, 2015).

Cependant, toutes les liaisons interatomiques ne sont pas capables d'absorber de l'énergie lumineuse infrarouge, même dans le cas où la fréquence de la lumière est la même que la fréquence propre de la liaison. Seules les liaisons qui présentent un moment électrique dipolaire oscillant sont actives dans l'infrarouge (Bertrand, 2002). On distingue les vibrations de valence, aussi appelées d'élongations, et les vibrations de déformations qui peuvent se produire dans le plan ou en dehors du plan **figure 9**. Une molécule polyatomique ayant N atomes est décrite par $3N$ coordonnées correspondant à différents types de mouvements (Lacheneil, 2000).

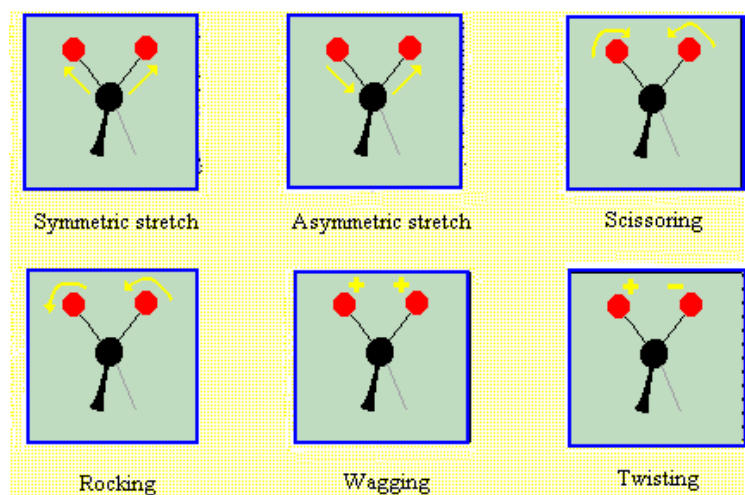


Figure 9 : Les différents modes de vibrations d'une molécule triatomique (CRA-W)

A chaque mode correspond une fréquence propre fondamentale et plusieurs autres fréquences associées aux harmoniques. De plus, on observe souvent des interactions entre le mode d'une liaison particulière et ceux d'autres liaisons. Ces interactions se traduisent par l'apparition de bandes de combinaison.

De telles bandes apparaissent à des fréquences qui sont elles-mêmes des combinaisons linéaires des fréquences des bandes fondamentales. Ainsi, comme pour les harmoniques, les bandes de combinaison apparaissent à des fréquences plus élevées que les bandes fondamentales. La région spectrale du proche infrarouge est le domaine des bandes harmoniques et des bandes de combinaison (Bertrand, 2002).

5.3.3 Principe de fonctionnement et appareillage

L'analyse des échantillons en spectroscopie infrarouge se fait soit en transmission soit en réflexion (Herent, 2015).

- **Mesure en réflexion**

Lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface d'un second milieu dont l'indice de réfraction est différent, il peut subir suivant l'angle d'incidence et le sens de la variation de l'indice, soit une réflexion totale comme sur un miroir, soit une réflexion atténuée, après avoir en partie pénétré dans le second milieu (Herent, 2015).

- **Mesure en transmission**

La transmittance (T) est définie comme étant la fraction d'énergie lumineuse traversant l'échantillon d'un bout à l'autre **figure 10**. C'est le rapport d'intensité multiplié par cent (Meurens, 2000).

$T = (I_T/I_0) \times 100$ avec, I_0 l'énergie incidente et I_T , l'énergie réfléchie (Meurens, 2000).

L'absorbance A est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance.

$$A = \log (1/T)$$

$$A = \log (I_0/I_T)$$

Loi de BEER-LAMBERT, qui fait de l'infrarouge une méthode quantitative, établit une relation de proportionnalité entre l'absorption de la lumière dans un échantillon, la concentration d'un composé de cet échantillon et la distance parcourue par la lumière. Cette loi est caractérisée par l'équation suivante : $A = a.b.c$. Il s'agit d'une relation linéaire entre l'absorbance (A) de l'échantillon, l'épaisseur (b), et la concentration (c) (Meurens, 2000).

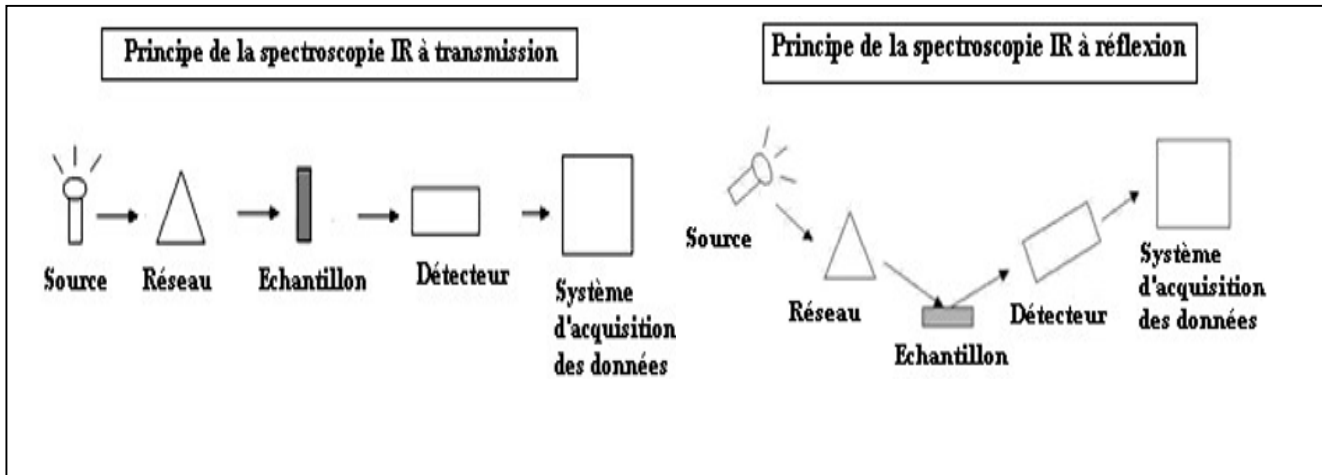


Figure 10 : Les différents modes d'analyse en spectroscopie infrarouge (Herent, 2015)

5.3.3.1 Instrumentation

Les spectres sont acquis à l'aide de spectromètres qui incluent au moins quatre parties essentielles **figure 11** : une source lumineuse, un système de séparation de lumière polychromatique en fonction des longueurs d'onde, un système permettant de présenter l'échantillon, un ou plusieurs capteurs photosensibles (Bertrand, 2002).

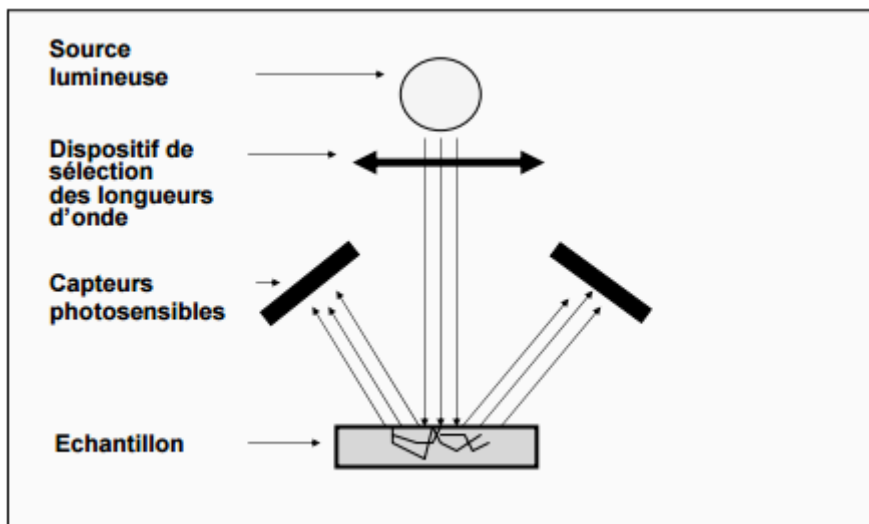


Figure 11: Principe de la spectroscopie (Bertrand and Dufour, 2006)

5.3.3.1.1 Sources lumineuses

Les différentes sources utilisées en spectroscopie infrarouge sont les sources thermiques, les diodes électroluminescentes et les lasers (Bertrand, 2000).

- **Source thermique**

La radiation lumineuse est le résultat de l'échauffement d'un filament métallique soumis à un courant électrique. Une ampoule électrique dont la température du filament avoisine 2600 K peut être considérée comme étant une source thermique. On dénombre plusieurs avantages à l'usage des sources thermiques : les rayonnements sont émis sur une large gamme de longueur d'onde et une diminution des problèmes d'amplification grâce à l'intensité élevée de la source. En spectroscopie proche infrarouge, ce sont les ampoules à filament de tungstène, dont la puissance électrique est comprise entre 10 et 250 KW qui sont utilisées comme sources lumineuses. La température requise pour des applications en infrarouge avoisine 2400 k (Bertrand, 2000).

- **Diode émettrice de lumière**

Diodes émettrices de lumières (light emitting diode ou LED) : pour les diodes émettrices de lumière, on utilise un semi-conducteur composé de gallium à jonction de type p-n. Les LED les plus utilisés sont à base d'arséniure de gallium (GaAs) dont la région d'émission se situe entre 900-970 nm. Pour des longueurs d'onde plus élevées, l'arséniure de gallium et d'indium (InGaAs) ou le phosphore-arséniure de gallium (GaAsP) sont utilisés (Bertrand, 2000).

- **Lasers et diodes à laser**

Le laser He-Ne est utilisé avec un instrument à transformée de Fourier, cela permet de situer de manière rigoureuse le miroir mobile. Les diodes à laser, dont le mode de fonctionnement est similaire à celui du laser, sont adaptées pour une analyse en spectroscopie proche infrarouge (Bertrand, 2000).

5.3.3.1.2 Séparateurs de longueurs d'onde

Ils vont permettre d'enregistrer les unes après les autres les mesures spectrales aux différentes longueurs d'onde de la lumière. On a les spectromètres séquentiels qui comprennent les appareils à filtres et les instruments multiplexés tel que le spectromètre à transformée de Fourier (Bertrand, 2000).

- **Spectromètre à filtres optiques interférentiels**

Les longueurs d'onde de la lumière pour ces appareils sont sélectionnées par des filtres optiques interférentiels.

Dans les spectromètres à filtres tournants, le rayon lumineux est perpendiculaire à la surface du filtre et l'angle d'incidence reste constant pour toutes les mesures (Bertrand, 2000).

Pour le spectromètre à filtres basculants, on effectue des mesures spectrales en faisant varier cet angle d'incidence. Cela permet d'accroître le nombre de longueurs d'onde sélectionnées avec chacun des filtres. Les filtres interférentiels ont pour objectif, lorsqu'ils sont éclairés avec une source de lumière polychromatique, de transmettre un rayon dont la lumière ne comporte qu'une plage étroite de longueurs d'onde. Ils mettent à profit des interférences obtenues à l'aide d'un système comportant deux surfaces semi-réfléchissantes. A noter que les spectromètres à filtre tournant sont le plus souvent utilisés en industrie agroalimentaire (Bertrand, 2000).

On dit qu'un système est multiplexé lorsqu'il est capable de transmettre plusieurs mesures simultanément sur le même circuit au canal (Stark et Luchter, 1992 cités par Meurens, 2000). Le spectromètre à transformée de Fourier fait partie des appareils multiplexés non dispersif dont le codage de l'information résulte de la modification temporelle des trajets optiques parcourus par les rayons lumineux (Meurens, 2000).

- **Spectromètre à transformée de Fourier**

Ce dispositif est fréquemment utilisé pour des applications analytiques avec des gammes spectrales dans le proche et moyen infrarouge (Meurens, 2000).

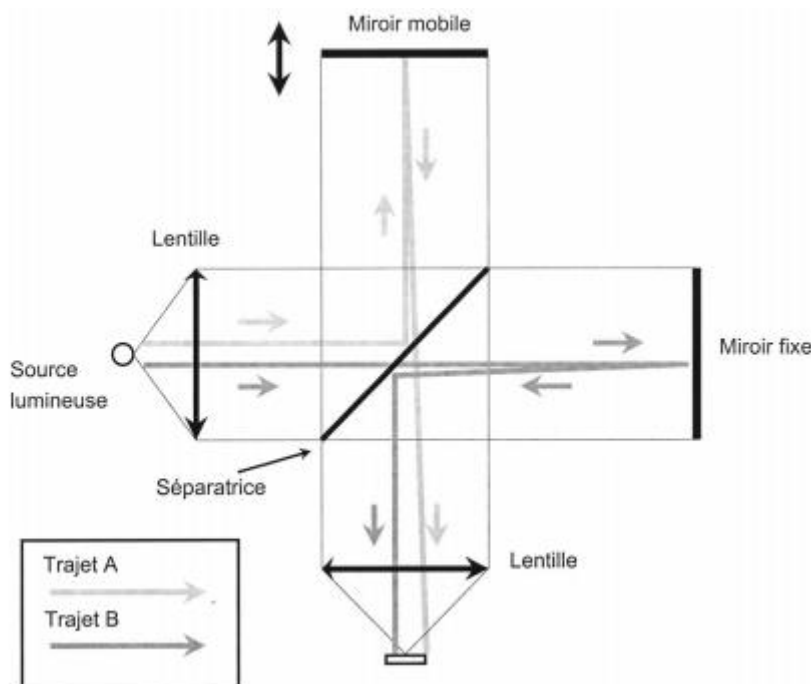


Figure 12: Principe d'un interféromètre de Michelson (spectromètre à transformée de Fourier) (Bertrand, 2002)

L'appareillage principal de ce spectromètre est l'interféromètre de Michelson (Diem, 1993). Cet interféromètre a un mode de fonctionnement similaire à celui de Fabry-Pérot qui permet une variation de l'écart entre deux lames semi-transparentes. La lumière issue de la source va être transformée en un rayon parallèle après son passage au travers de lentilles et de l'interféromètre. Ce rayon va atteindre une séparatrice, qui va diviser l'intensité du rayonnement en deux : une moitié sera réfléchie et l'autre moitié sera transmise. La part d'intensité réfléchie pourra de nouveau atteindre la séparatrice et être transmise en partie vers le détecteur (trajet A) mais aussi vers le détecteur correspondant au trajet B. Si on considère maintenant une source de lumière monochromatique, avec une longueur d'onde λ et la condition selon laquelle les bras de l'interféromètre ont une longueur identique. On observera des interférences constructives ou destructives qui seront fonction du déplacement du miroir mobile (Bertrand, 2000).

5.3.3.1.3 Détecteurs

- **Les détecteurs photosensibles**

On distingue 3 types de détecteurs : les détecteurs photoémissifs, les détecteurs thermiques et les détecteurs à semi-conducteurs.

Dans les détecteurs photoémissifs, la lumière interagit directement avec les électrons de la photocathode. La photodiode à vide est un exemple de détecteur photoémissif. Dans ce dispositif, l'énergie du photon est capable d'arracher un électron à la photocathode placée dans le vide (Bertrand, 2000).

Les détecteurs thermiques sont sensibles à l'élévation de température provoquée par la radiation lumineuse incidente. On peut les classer en trois groupes : les thermocouples, les thermopiles et les détecteurs pyroélectriques. Un thermocouple consiste en une connexion en série de deux métaux distincts qui sont le plus souvent le bismuth et l'antimoine. Une jonction noircie absorbe les radiations lumineuses, on va observer suite à cela, un relèvement de température qui va entraîner une différence de potentiel mesurable au voltmètre. A noter qu'il est possible d'augmenter le voltage de sortie par ajout de plusieurs thermocouples connectés en série, ce qui conduit à la formation des thermopiles. Le type pyroélectrique est en cristallin et se dilate sous l'effet de la température (Bertrand, 2000).

Les détecteurs à semi-conducteurs, reposent sur la variation de la conductivité d'un unique matériau en fonction de la lumière incidente sont appelés photoconductifs.

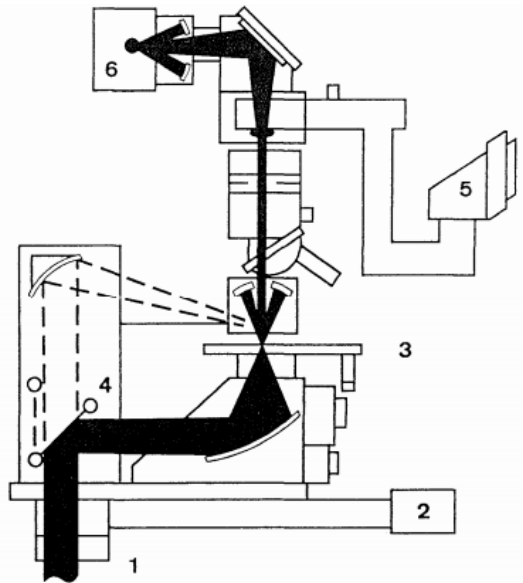
La production de charge électrique pour ces détecteurs est permise par les photons incidents absorbés. Ces photons incidents sont à l'origine d'une variation de la conductivité du détecteur. En spectroscopie proche infrarouge, le détecteur photoconductif le plus couramment mis en œuvre est composé de sulfure de plomb qui permet une détection sur la gamme spectrale de 1100 à 2000 nm avec un temps de réponse relativement long (Bertrand, 2000).

5.4 la microscopie proche infrarouge (NIRM)

La microscopie infrarouge est le couplage entre le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier et le microscope optique. L'appareillage utilisé doit permettre de prendre le spectre de particules dont la taille est de l'ordre de la centaine de microns (Piroux and Dardenne, 2000). Tous les aspects du couplage de la microscopie et de la spectroscopie nécessitent la compréhension et l'application des principes fondamentaux de ces deux méthodes (Humecki, 1995). En microscopie optique, la qualité de l'image visuelle est un bon indicateur des performances du microscope, or en spectroscopie, on ne tient pas compte de cet aspect. Ce qui rend difficile l'évaluation des performances du spectromètre. Pour une bonne qualité spectrale en MIR, il faut tenir compte de deux critères : l'énergie traversant le spectromètre et la surface de l'échantillon qui doit être bien définie (Humecki, 1995).

5.4.1 Principe de fonctionnement

Le rayon infrarouge (IR) généré par l'interféromètre est envoyé vers le microscope. Au niveau du microscope, une caméra vidéo permet de visualiser l'échantillon et de localiser sur celui-ci, la particule que l'on veut analyser. Le rayon infrarouge est dirigé sur la particule à analyser et un détecteur permet d'enregistrer son spectre. L'acquisition des spectres peut être faite soit en réflexion soit en transmission (Piroux and Dardenne, 2000).



1. Symbolise le faisceau infrarouge issu de l'échantillon,
2. L'éclairage de l'échantillon,
3. La platine motorisée du microscope,
4. Le miroir de sélection du mode soit transmission ou réflexion,
5. Le viseur optique
6. Le détecteur

¹⁴Figure 13: Trajet optique du faisceau IR dans la partie microscope

5.5 Imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI)

5.5.1 Principe de fonctionnement

L'imagerie hyperspectrale est une méthode qui permet de combiner la spectroscopie proche infrarouge et l'imagerie conventionnelle pour obtenir une information spatiale et spectrale d'un objet (Gowen *et al.*, 2007).

Solomon and Rock, (1985) définissent l'imagerie hyperspectrale comme étant l'acquisition d'images dans des centaines de bandes spectrales contiguës et identiquement géo-référencées, telles que l'on peut dériver un spectre de réflectance complet pour chaque élément d'une image (Solomon and Rock, 1985). Les images hyperspectrales aussi appelées hypercubes sont un ensemble de données en trois dimensions avec des mesures d'intensité de lumière : les deux premières dimensions X et Y, la position spatiale et la troisième dimension λ , qui définit le profil spectral **figure 14** (Dale *et al.*, 2013).

¹⁴Source : <http://www.fsr.ac.ma/cours/chimie/EI%20hajji/master%20de%20sciences%20analytique%20spectroscopie%20Infrarouge/Master%20Sc%20Anal%20M2%20Cours%20IR.pdf>

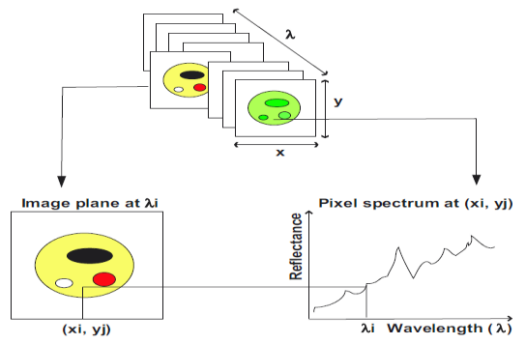


Figure 14: Représentation des trois dimensions d'un hypercube (Gowen et al., 2007)

Pour acquérir des images hyperspectrales, trois grandes méthodes existent (Vigneau, 2010):

- Le whiskroom system permet d'acquérir l'ensemble des longueurs d'onde mais pour un pixel seulement à chaque fois.
- Le push-broom system permet d'acquérir une série d'images lignes où pour chaque pixel d'une ligne, un spectre complet est mesuré.
- Staring system permet d'acquérir une série d'images 2D à différentes longueurs d'onde.

Le système line scan ou push-broom va projeter une ligne de lumière dans un plan focal à deux dimensions. Ceci permet de tenir compte des variations aussi bien pour l'éclairage de l'échantillon que pour le débit de l'instrument (Vermeulen et Vincke, 2016). Le plane scan, ou whiskroom, positionne la caméra parallèlement à la surface de l'échantillon, ce qui permet d'avoir une image spatiale dont la taille est fixée par les dimensions du détecteur de la caméra. Les images hyperspectrales sont obtenues par modulation du rayonnement atteignant la caméra soit avec une bande passante soit par le biais de filtres accordables positionnés à l'avant de l'appareil (Vermeulen et Vincke, 2016). Le staring system s'emploie uniquement en laboratoire notamment dans les secteurs pharmaceutiques et agroalimentaires. Il utilise des filtres variables placés devant une caméra matricielle (vigneau, 2010).

L'imagerie hyperspectrale est composée d'un objectif, d'une caméra, d'un spectrographe, d'un système d'acquisition, d'un support de présentation des échantillons (tapis roulant ou autre), d'un éclairage et d'un ordinateur. La gamme spectrale du système sera fonction du spectrographe. L'échantillon est généralement éclairé par un halogène-tungstène ou avec une LED (Gowen et al., 2007).

6. APPLICATIONS

- **SPIR**

Une étude menée par Vermeulen *et al.* (2009) a permis de discriminer le sclérote du grain de blé par spectroscopie infrarouge couplé aux méthodes chimiométriques (Vermeulen *et al.*, 2009). Devaux *et al.*, (1986) ont utilisé la spectroscopie proche infrarouge pour l'identification des variétés de blé convenables pour la cuisson du pain (Devaux *et al.*, 1986).

Miralbés, (2008) a utilisé cette méthode pour pouvoir discriminer les variétés de blé provenant de France et d'Espagne (Miralbés, 2008). Cette méthode peut être utilisée pour déterminer la composition chimique des céréales mais aussi pour la discrimination variétale et la traçabilité des céréales (Cozzolino, 2014).

- **NIRM**

Fernández-Ibáñez *et al.*, (2010) ont réalisé une étude sur la création d'une librairie spectrale, à partir d'ingrédients d'origine animale et végétale, dans lesquels on retrouve notamment le blé, l'avoine, le seigle, l'orge et le maïs par microscopie proche infrarouge. Pour ce faire, ils ont utilisé le système auto image du microscope connecté au spectromètre à transformée de Fourier, en mode réflectance, avec une plage de longueurs d'onde de 1112–2500 nm. Les spectres obtenus ont été traités par les méthodes chimiométriques et la classification s'est faite par la méthode des K plus proches voisins. Le résultat de cette étude a mis en exergue plusieurs choses ; l'absence de confusion entre les ingrédients d'origine animale et ceux d'origine végétale. Lorsqu'on considère uniquement le groupe des végétaux, la majorité des céréales a été bien classée. Cependant, plusieurs confusions internes ont été observées entre le blé, l'orge et le maïs. Ils ont obtenu des spectres d'absorption identiques, qui pourraient s'expliquer par la composition de ces céréales, notamment leur teneur en amidon. Cela met en évidence une limite de cette méthode à discriminer les céréales de compositions proches (Fernández-Ibáñez *et al.*, 2010).

- **NIR-HSI**

Ravikanth *et al.*, (2015) ont mené une étude sur la classification des contaminants des grains de blé par imagerie hyperspectrale en proche infrarouge. Pour ce faire, plusieurs expériences ont été réalisées, à savoir identifier dans le blé les substances étrangères, les impuretés et les déjections animales.

Ensuite, classer ces différents contaminants grâce aux méthodes de traitement de données. L'acquisition d'images s'est faite à l'aide de la camera IngasAs, avec une gamme de longueurs d'onde entre 1000-1600 nm et un incrément de 10 nm. Plusieurs prétraitements ont été testés dans le but de choisir celui qui permettrait d'avoir une meilleure correction spectrale et une meilleure précision pour la classification des contaminants du blé. Ils ont montré à travers cette étude qu'il est possible d'identifier et de classer les contaminants du blé par imagerie hyperspectrale avec de meilleurs résultats lorsque la SNV est appliquée en prétraitement couplée à la méthode de classification K-NN (Ravikanth et al., 2015).

Une autre étude sur la détection des impuretés dans trois céréales ; le blé, l'épeautre et l'orge a été réalisée par Fernández Pierna et al., (2012). Pour cette étude, les images hyperspectrales ont été obtenues grâce au système whiskroom. L'analyse s'est faite avec un total de 112 échantillons. Une librairie spectrale de 24000 spectres est obtenue, cette base de données comprend les spectres de blé, d'épeautre, d'orge, de colza, de cellulose, de déchets (bois et paille), de contaminants des animaux (insectes) et d'autres contaminants (peintures, plastiques et pierres). Après un prétraitement, une PCA a permis de séparer clairement certains groupes : les insectes et les pierres mais pas les autres groupes. Sur cette base, un modèle discriminant à partir de cinq échantillons (céréales, impuretés botaniques, la cellulose des déchets, et d'autres contaminants) a été établi par la machine à vecteur de support. Tous les échantillons ont été détectés. Cette étude a permis de mettre en exergue la détection simultanée dans les céréales d'une série de contaminants d'origines différentes (Fernández Pierna et al., 2012).

Enfin, Vermeulen et al., (2012) ont montré dans leur étude qu'il est possible de détecter et de quantifier l'ergot dans les céréales selon les limites fixées par la législation Européenne, par imagerie hyperspectrale. Pour arriver à cette conclusion, sept échantillons de blé avec des concentrations croissantes en ergot ont été préparés et un huitième échantillon a été utilisé pour la validation. L'acquisition d'images s'est faite grâce au système push-broom. Après la création des librairies, les modèles ont été développés par des méthodes chimiométriques : PLS-DA et SVM avec des échantillons de blé pur, d'ergot pur, appliqués aux échantillons de blé avec des concentrations croissantes en ergot (Vermeulen et al., 2012).

7. CHIMIOMETRIE

La chimiométrie est une discipline chimique qui utilise les mathématiques, les statistiques et la logique formelle pour concevoir ou sélectionner des procédures expérimentales optimales, afin de fournir le maximum d'informations chimiques pertinentes par l'analyse des données chimiques et d'obtenir des connaissances sur les systèmes chimiques (Massart *et al.*, 1997). D'une manière générale, les spectres proche infrarouge et moyen infrarouge de substrats naturels ou de produits agroalimentaires contiennent des informations qui présentent un intérêt analytique. Cependant, l'extraction de ces informations n'est pas immédiate et demande presque toujours un traitement mathématique assez complexe (Bertrand et Qannari, 2000). L'approche chimiométrique permet d'exploiter la plus grande partie de l'information sans faire d'hypothèses trop restrictives sur le plan de la théorie spectrale (Bertrand et Qannari, 2000).

Les méthodes chimiométriques peuvent avoir deux objectifs principaux : la description des données sous une forme synthétique ou la prédiction. Les méthodes exploratoires correspondent à l'objectif de description des données et comprennent à la fois des méthodes élémentaires telles que le calcul de la moyenne et de l'écart-type des spectres ou des méthodes plus sophistiquées comme l'analyse en composantes principales. Le regroupement des spectres dans des classes homogènes est l'objet des méthodes de classification. De telles méthodes sont utiles, par exemple, lorsque l'utilisateur souhaite, sans *a priori*, créer des groupes de spectres de même nature. Les méthodes prédictives pour objectif de prédire au mieux à partir des données, les valeurs d'une ou plusieurs variables pour de nouveaux échantillons. Dans les applications analytiques, le cas le plus fréquemment rencontré correspond à la prédiction d'une variable quantitative, telle que la concentration d'un composant présent dans le produit étudié. La plus connue est la régression linéaire multiple, dans laquelle les variables prédictives sont les données spectrales (Bertrand et Qannari, 2000).

7.1 La méthode exploratoire

7.1.1. L'analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale est particulièrement bien adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales. Cette méthode donne une représentation synthétique et visuelle. Elle permet d'obtenir des cartes factorielles ou cartes de ressemblance dans lesquelles chaque spectre est représenté par un point sur un graphique. Deux spectres présentant une similitude se placent à des positions voisines sur ces cartes (Bertrand *et al.*, 2000).

L'ACP permet de remplacer les variables d'origine (absorbances), fortement redondantes, par des variables synthétiques, les composantes principales qui contiennent la quasi-totalité de l'information, et qui ont l'avantage d'être non corrélées, ou orthogonales entre elles (Bertrand et al., 2000).

7.2 Les méthodes prédictives

Les méthodes prédictives (régression et discrimination) utilisées pour construire une équation d'étalonnage à partir de données spectrales sont nombreuses. Elles peuvent être classées en méthodes de régression et méthodes de discrimination (Boubellouta, 2008).

7.2.1 Régression linéaire

L'analyse par spectroscopie nécessite un étalonnage permettant d'établir la liaison entre une variable à prédire et les spectres des individus considérés, représentés par les mesures spectrales aux différentes longueurs d'onde. La régression linéaire est une technique qui permet d'établir des équations de prédiction (ou modèles) permettant de relier la variable y (variable dite à expliquer ou dépendante) et des variables x_1, x_2, \dots, x_p dites explicatives, prédictives ou indépendantes. On distingue deux types de régressions linéaires : la régression linéaire simple et multiple (Vigneau et al., 2000).¹⁵ Le modèle de régression linéaire multiple est l'outil statistique le plus habituellement mis en œuvre pour l'étude de données multidimensionnelles. Cas particulier de modèle linéaire, il constitue la généralisation naturelle de la régression simple.

- **La méthode des moindres carrés partiels (PLS)**

La méthode PLS consiste en une régression de la variable à prédire y sur les variables $t_1, t_2 \dots$ qui sont latentes (combinaisons linéaires de x_1, x_2, \dots, x_p). Elle procède de manière itérative et détermine à chaque pas une variable latente qui est fortement reliée à Y . La force de la liaison est mesurée par l'importance de la covariance (vigneau et al., 2000).

7.2.2 Discrimination

Les méthodes de discrimination, appelées aussi méthodes d'apprentissages supervisés, ont pour objet de mettre en relation une variable qualitative indiquant l'appartenance des individus à des groupes et un ensemble de variables quantitatives. Dans ce cas, la structuration de la

¹⁵ <http://www.math.univ-toulouse.fr/~besse/Wikistat/pdf/st-l-inf-intRegmult.pdf>

population étudiée en groupes est connue *a priori*. La connaissance de l'appartenance des individus aux différents groupes est alors utilisée pour définir une règle d'affectation. Les analyses discriminantes peuvent avoir plusieurs objectifs : prédire le groupe d'appartenance de nouveaux individus ou tester la significativité d'une partition donnée. Elles peuvent également avoir comme objectif de rechercher un sous-ensemble de variables qui permet d'obtenir une séparation des groupes la plus efficiente possible (vigneau et al., 2000).

- **Méthodes des moindres carrés partiels – Analyse Discriminante (PLS-DA)**

C'est une technique chimiométrique utilisée pour optimiser la séparation entre différents groupes d'échantillons, par couplage de deux matrices de données X et Y (Gromski et al., 2015). La PLS-DA est une méthode de classification linéaire qui combine les propriétés de régression des moindres carrés partiels avec le pouvoir discriminant de la classification. La PLS-DA repose sur l'algorithme de la régression PLS (PLS1 traite une variable dépendante Y et PLS2 qui présente plusieurs variables dépendantes Y) qui recherche les variables latentes avec un maximum de covariance avec la variable Y (Ballabio and Consonni, 2013).

III. MATERIEL ET METHODE

L'objectif de ce travail est le développement de méthodes en SPIR, NIRM, NIR-HSI et en microscopie optique, pour la détection et la quantification de l'ergot dans les farines de céréales. Dans cette partie seront présentés : les échantillons analysés, suivie d'une description des quatre instruments utilisés y compris les modes opératoires. La méthodologie adoptée pour le traitement de données sera également exposée.

1. DESCRIPTION DES ECHANTILLONS

Dans le cadre de ce mémoire, 40 échantillons ont été analysés pour la création des bibliothèques utilisées pour construire les modèles.

- **Farines du supermarché**

Les premières bibliothèques ont été créées avec 11 échantillons de farines de céréales provenant du supermarché Carrefour. On disposait au départ, d'un kilogramme pour chaque type de farine. Mais, seule une fraction de tous les échantillons a été transférée après homogénéisation dans de petits pots **figure 15**.

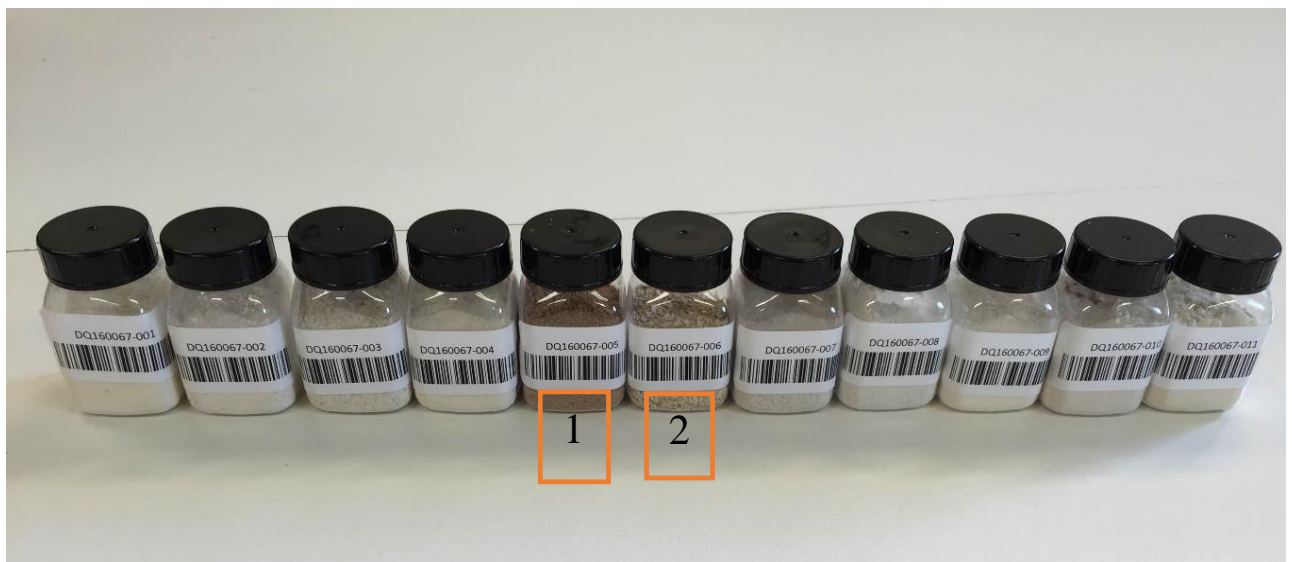


Figure 15 : Echantillons de farine du supermarché (image personnelle)

- 1 Echantillon de son de blé
- 2 Echantillon de son d'avoine

Les échantillons de son de blé et d'avoine sont mis en évidence pour souligner la différence de couleur par rapport aux autres farines.

Tableau 4 : ¹⁶Composition chimique des farines de céréales

Type de farine	Matière grasse	Glucide	Protéine
Farine blanche de blé	1,1 g	70,6 g	8,9 g
Farine complète de blé	1,1 g	74 g	11 g
Farine semi complète de blé	0,8 g	67,2 g	11,4 g
Farine semi complète de blé	1,3 g	71 g	11 g
Farine de riz-soja + amidon de maïs	3 g	71,4 g	7,8 g
Farine de quinoa	6,5 g	57,5 g	11,7 g
Farine de seigle	1,2 g	69 g	12 g
Son d'avoine	7 g	51 g	17 g
Son de blé	4,7 g	18 g	16 g
Farine d'épeautre	1,2 g	69 g	12 g
Farine de sarrasin	3,3 g	61 g	13 g

- **Ergot pur**

Les poudres d'ergot pur ont été obtenues à partir de trois échantillons de sclérotés dont deux ont été fournis par Arvalis : 50 g de sclérote de blé et 50 g de sclérote de seigle. Le troisième échantillon provient du CRA-W. Ces sclérotés ont été broyés puis tamisés, afin d'obtenir des poudres d'ergot pur, de différentes granulométries : soit inférieure à 1000 µm soit supérieure à 1000 µm **figure 16 et 17**.

¹⁶ Composition pour 100g de farine



Figure 16: Trois échantillons de sclérote (image personnelle)



Figure 17 : Six poudres d'ergot pur de trois sources à deux granulométries (image personnelle)



Figure 18 : Dispositif de tamisage (CRA-W) Figure 19 : Instrument de broyage (CRA-W)

Les **figures 18 et 19** présentent respectivement, le tamiseur et le broyeur qui ont permis d'obtenir de plus fines particules.

- **Mélange farine - ergot pur**

La farine blanche et la poudre d'ergot pur de blé ont permis de faire 5 mélanges farine-ergot de différentes proportions (farine / ergot pur) : 50/50, 80/20, 90/10, 95/05, 99/01. Pour ce faire, de faibles quantités ont été considérées pour constituer différents pourcentages **tableau 5**.

Tableau 5 : Volume du mélange farine-ergot

Pourcentage farine-ergot (%)	Volume farine-ergot (g)
50-50	0,025-0,025
80-20	0,040-0,010
90-10	0,0450-0,005
95-05	0,0475-0,0025
99-01	0,0495-0,0005

- **Farines contaminées à l'ergot**

Arvalis a fourni ces échantillons adultérés **figure 20** avec les concentrations en alcaloïdes et les pourcentages en ergot **Annexe 1**. Les sclérotés de l'ergot contiennent des substances toxiques pour l'Homme et les animaux en cas d'ingestion : ce sont les alcaloïdes. La quantité d'alcaloïdes contenue dans un sclérote peut varier de 0,01 à 0,5 % (Cornière, 2014). Ainsi, il est important d'étudier la relation ergot-alcaloïde.



Figure 20 : Treize échantillons adultérés en ergot fournis par Arvalis (image personnelle)

- Remarques
 - Pour les analyses en SPIR, les mélanges farines-ergot n'ont pas été réalisés. On ne disposait plus de suffisamment d'échantillons pour faire ces mélanges.
 - Pour les analyses en NIRM, les particules d'ergot pur avec une granulométrie supérieure à 1000 µm n'ont pas été analysées. L'appareil ne permet pas d'obtenir de bons spectres avec des grosses particules.

Le nombre total d'échantillons analysés est différent pour chacune des méthodes infrarouges utilisées dans ce mémoire **tableau 6**.

Tableau 6 : Echantillons analysés par les différentes méthodes en proche infrarouge

Analyse	Farine pure	Ergot pur	Mélange F-E	Ech Arvalis	Nbre T. Ech
SPIR	11	6	0	13	30
NIRM	11	3	2x5	13	37
NIR-HSI	11	6	2x5	13	40

F=Farine, E= Ergot, Ech = Echantillon, Nbre = Nombre, T = Total

Pour le mélange farine-ergot, nous avons réalisé 2x5 analyses de mélange avec les teneurs (farine / ergot) de 50/50, 20/80, 90/10, 95/05, 99/0. Les cinq premiers mélanges sont présentés sur le support en vue de l'analyse sous forme de mixture. Les cinq derniers mélanges sont présentés sur le support sous forme de superposition (première couche constituée de farine pure et deuxième couche constituée d'ergot pur).

2. ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE (SPIR)

2.1 Appareillage

L'analyseur XDS Rapid Content Analyzer (RCA) **figure 21** permet des analyses rapides sur tout type d'échantillon des produits solides, liquides ou pâteux.

2.2 Mode opératoire

Pour effectuer une mesure avec le XDS, l'échantillon homogénéisé est placé dans une coupelle en quartz **figure 22**. La surface mesurée est de quelques centimètres carrés. Le rayon lumineux pénètre peu profondément à l'intérieur de la matière. Pour cette raison, le produit doit être finement broyé et homogénéisé (Bertrand, 2002). La coupelle contenant la farine est ensuite introduite dans la fenêtre de mesure du Foss XDS et analysée en mode réflectance **figure 23**. Tous les échantillons sont analysés trois fois à raison de 32 scans par mesure. On obtient en fin d'analyse, un spectre qui est une moyenne des 32 scans.

L'analyse est faite trois fois afin d'obtenir 3 spectres par échantillon. La cellule est vidée et nettoyée entre mesures successives à l'aide d'un pinceau. Le background est effectué toutes les 20 minutes.



Figure 21 : Instrument de spectrométrie proche infrarouge (Foss XDS) (CRA-W)



Figure 22 : Coupelle contenant un échantillon de farine adultéré en ergot (image personnelle)



Figure 23 : Coupelle introduite dans la fenêtre de mesure pour l'analyse (image personnelle)

3. ANALYSE PAR MICROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE (NIRM)

3.1 Appareillage

L'appareil (Bruker Hypériorion 3000) est composé d'un spectromètre qui va générer le rayon infrarouge. Ce spectromètre est couplé au microscope qui va concentrer le rayon infrarouge sur une surface prédéfinie. Le microscope est composé d'un écran, d'un oculaire qui permet de visualiser l'échantillon, une tourelle munie de différents objectifs et d'une plateforme motorisée avec un pas de déplacement d'1 μm **figure 24**. Le microscope est aussi muni d'une caméra visible qui permet de visualiser l'échantillon sur l'écran de l'ordinateur. Il est possible avec cet appareil d'effectuer des mesures en proche et moyen infrarouge. Le détecteur proche infrarouge est un détecteur de type InGAS. L'analyse peut se faire de deux manières :

- Soit « manuelle », on prend une mesure à la fois.
- Soit, l'option « mapping » qui permet d'automatiser la mesure et d'obtenir dans certains cas plus de 10000 spectres en une seule analyse.

Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour optimiser la qualité des spectres.

- La résolution spatiale qui est la distance entre deux points : plus la résolution sera importante plus les spectres obtenus seront de meilleure qualité.
- Le scan est le nombre de mesures prises par l'appareil pour un échantillon. Plus il est élevé, plus on obtient des spectres de qualité. Toutefois, l'optimisation de ces paramètres ne doit pas se faire au détriment du temps de mesure. En effet, plus on augmente le nombre de scans et la résolution de l'appareil, plus l'analyse sera longue.
- L'aperture permet de réguler l'énergie émise par la source, afin d'éviter d'avoir trop d'énergie et de saturer le détecteur. Lorsque ce dernier est saturé, les spectres obtenus sont mauvais et difficilement exploitables.



- 1- Spectromètre
- 2 - Caméra
- 3 -Oculaire
- 4 -Ecran
- 5 -Objectifs
- 6- Plateforme motorisée
- 7- Choix du mode pour l'analyse
- 8 - Joystick

Figure 24 : Microscope infrarouge Bruker Hypérior 3000 installé au CRA-W

3.2 Choix du mode d'analyse

Pour pouvoir créer les bibliothèques spectrales, il est primordial de déterminer le mode par lequel les analyses vont être effectuées, ainsi que la fenêtre de mesure à utiliser. Pour ce faire, une comparaison des deux modes d'analyse a été faite selon les critères suivants : choisir le mode qui permet d'obtenir de bons spectres, en grand nombre, avec une fenêtre de mesure la plus petite possible. L'analyse est faite sur des farines de céréales, autrement dit, la mesure est réalisée sur des particules fines. Plus la fenêtre de mesure est petite, meilleure sera la résolution spatiale. Il s'est avéré après comparaison des modes, que l'analyse en transmission avec une fenêtre de 50 μm répondait à ces critères **Annexe 2**.

3.3 Mode opératoire

Après homogénéisation, une fraction de l'échantillon est dispersée sur un verre en quartz **figure 25** en monocouche à l'aide d'un tamis de 500 μm . La surface de mesure est un carré d'un centimètre de côté. Le verre est ensuite fixé sur la plaque motorisée en vue de l'analyse en transmission. Il est important de régler au préalable correctement le condenseur pour avoir uniquement la quantité d'énergie nécessaire pour l'analyse. L'option mapping a permis d'obtenir 400 spectres en 30 minutes, avec un background pris tous les 50 spectres. Les paramètres utilisés en transmission avec une fenêtre de mesure de 50 μm sont : une résolution de 16 cm^{-1} , une ouverture de 8 mm et 8 scans. Après l'analyse, les logiciels OPUS/LAB 7.2 (Bruker, Allemagne) et Unscrambler X3 (Camo, Norvège) permettent respectivement de visualiser les spectres et de convertir les données en fichier Matlab, en vue d'un traitement de données avec PLS -toolbox (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA).

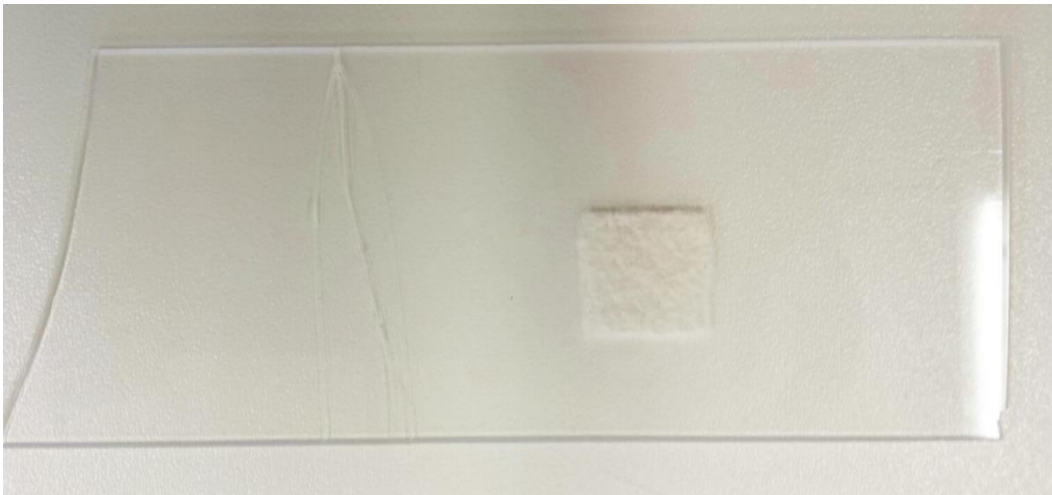


Figure 25 : Echantillon de farine blanche disposé sur un verre en quartz prêt pour l'analyse (image personnelle)

4. DESCRIPTION DE L'IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE (NIR-HSI)

4.1 Appareillage

Les images des échantillons sont obtenues grâce à la camera line scan qui se trouve au-dessus de la bande transporteuse **figure 26**. Ce système a été développé par BurgerMetrics SIA (Riga, Lettonie), il est composé d'une caméra Xenics (Leuven, Belgique) et d'un spectrographe Specim Ltd (Oulu, Finlande). Les images hyperspectrales acquises sont ensuite analysées par le logiciel HyperSee développé par BurgerMetrics SIA (Riga, Lettonie). Cette caméra utilise le détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure) bidimensionnel, perpendiculaire à la surface de l'échantillon. Le MCT est équipé d'un système de refroidissement et d'un stabilisateur de température pour éviter une surchauffe. L'appareil est aussi muni d'une source composée de deux spots lumineux de 150 Watts qui éclairent l'échantillon analysé **figure 26**.

Les images sont caractérisées par une largeur (X), de 320 pixels acquis à 209 longueurs d'onde différentes (Z) et une longueur (Y), qui varie en fonction du nombre de lignes collectées **figure 14**. Pour chaque pixel, la réflectance est mesurée 32 fois à 209 longueurs d'ondes, dans une gamme de 1118 nm à 2425 nm, avec une résolution spectrale de 6.3 nm. Le spectre enregistré pour chaque pixel de l'image est calculé en faisant la moyenne des 32 mesures (Fernandez Pierna *et al.*, 2014 ; Vermeulen *et al.*, 2012). L'objectif utilisé est le macrolens car la largeur de l'échantillon analysé est de 1 cm. Avec cette configuration, la résolution spatiale de la caméra est de 30 μm . La caméra doit être préchauffée 1 heure avant de pouvoir être utilisée. En début de journée, le système est calibré sur une image noire par fermeture de la lentille et sur une image blanche en faisant l'acquisition du spectre d'une céramique blanche. Cette calibration permet de compenser la dérive due au courant d'obscurité, à la variation de température de la source lumineuse et à l'hétérogénéité spatiale de l'éclairage (Vermeulen *et al.*, 2012). Par ailleurs, la vitesse du tapis est réglée à chaque allumage du système à l'aide d'un étalon vitesse permettant d'avoir toujours des pixels carrés.

7.3 Mode opératoire

Les échantillons de farines après homogénéisation sont dispersés sous forme de monocouche sur du téflon, à l'aide d'un carton découpé en un carré d'un centimètre de côté et d'un tamis de 500 μm **figures 27 et 28**. Le téflon est posé sur la bande transporteuse en vue d'une mesure en réflectance.

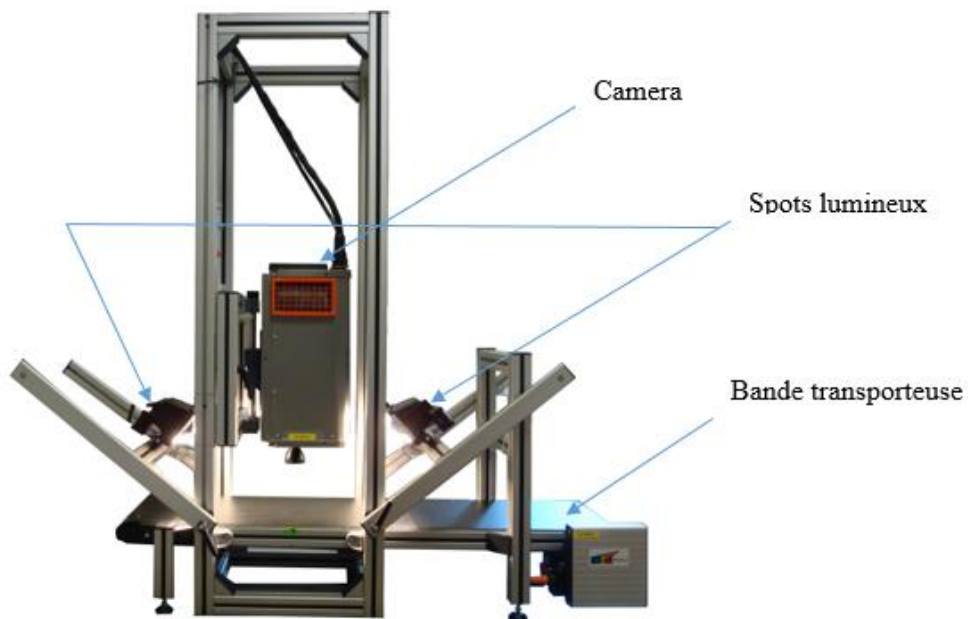


Figure 26 : Imagerie hyperspectrale proche infrarouge Burgermetrics line scan (CRA-W)



Figure 27 : Disposition d'un échantillon de mélange farine -alcaloïdes sur le téflon (image personnelle)

Le carton est constitué d'un carré d'un centimètre de côté placé sur le téflon. Après homogénéisation de l'échantillon, une petite quantité de ce dernier est transférée dans le tamis, puis dispersée sous forme de monocouche sur le téflon à travers le carré.

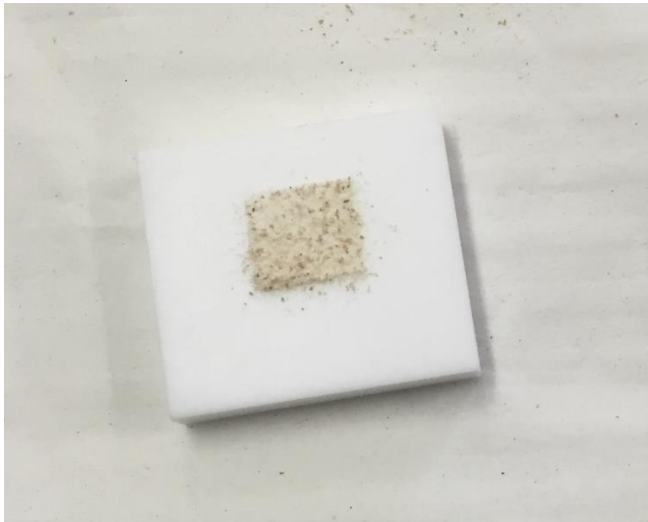


Figure 28 : L'échantillon de mélange farine-alcaloïdes prêt pour l'analyse en NIR-HSI (image personnelle)

Tableau 7 : Comparaison des paramètres d'analyse des méthodes infrarouges

	SPIR	NIRM	NIR-HSI
Fenêtre de mesure	17,25 nm	50 μ m	30 μ m
Mode d'analyse	Réflexion	Transmission	Réflexion
Nbre de scan	32	32	32
Plage spectrale	400 nm à 2500 nm	118 nm à 2425 nm	1118 nm à 2425 nm
Nbre spectres par éch	1	400	Plus de 10000
Pas de mesure	2 nm	2 nm	6,3 nm

Nbre = Nombre, éch = échantillon

5. ANALYSE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE

5.1 Appareillage

Le microscope optique est un instrument qui permet d'observer des objets très minces qui peuvent être traversés par la lumière. L'analyse se fait donc en transmission. Le microscope utilisé pour observer les échantillons a été développé par ZEISS (Oberkochen, Allemagne). Les composantes principales de l'appareil sont représentées à la **figure 29**.

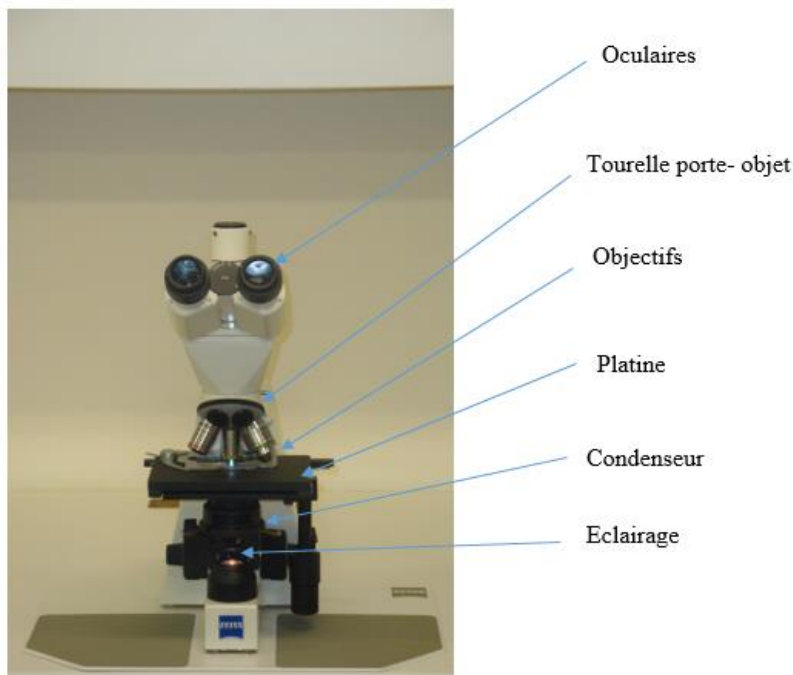


Figure 29 : Instrument de microscopie optique ZEISS (CRA-W)

Pour cette partie, l'approche est tout à fait différente. En effet, il ne s'agit pas ici de créer des bibliothèques pour construire un modèle, mais plutôt d'explorer les possibilités de la microscopie optique qui peuvent répondre à la problématique de ce mémoire. Pour ce faire, les échantillons de farine blanche, de farine complète, de son de blé et d'ergot pur de blé ont été utilisés.

5.2 Mode opératoire

Après une première homogénéisation, une fraction de l'échantillon est tamisée à l'aide d'un tamis de 250 μm pour obtenir de plus fines particules pour l'analyse. On fait ensuite une deuxième homogénéisation avant la coloration au rouge soudan.

Après coloration, l'échantillon est monté entre une lame port objet et une lamelle couvre objet grâce à une goutte de glycérol. Enfin, la fraction est analysée au microscope en fond clair et en polarisation. A noter que les échantillons d'ergot pur de blé, de son de blé et de farine blanche ont fait l'objet d'une double préparation pour l'analyse. En effet, ils ont été observés dans un premier temps après une coloration au soudan rouge, puis dans un deuxième temps sans coloration, mais avec le même agent de montage et dans les conditions d'observations identiques.

6. METHODOLOGIE DU TRAITEMENT DE DONNEES

Trois outils de chimiométrie ont été utilisés dans le cadre de ce mémoire. Premièrement, la PCA a permis une analyse exploratoire des données. Deuxièmement, la construction des modèles de classification a été possible grâce à la PLS-DA. Enfin, la conception des modèles d'étalonnage s'est faite par la PLS.

Les données spectrales obtenues en SPIR, en NIRM et en NIR-HSI ont été converties en format Matlab grâce au logiciel Matlab développé par MathWorks, Inc. (Natick, MA, USA). La conception des modèles et les prédictions ont été effectuées par le logiciel PLS-toolbox version 7.0.2 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA). Les spectres acquis après l'analyse ont été nettoyés au préalable grâce à un script Matlab, avant le prétraitement. Cela permet de supprimer les spectres du support « background ».

6.1 Prétraitement des données spectrales

Les spectres en proche infrarouge sont influencés par plusieurs paramètres : les variations des propriétés chimiques et physiques des échantillons, le processus de mesure et le spectromètre (Büchi NIRCal cité par Fernandez Pierna, 2016). Le prétraitement permet d'éliminer au sein de l'information spectrale, les biais qui ne sont pas dus à la composition chimique de l'échantillon et de préparer les données à un traitement ultérieur. De plus, il n'affecte pas les spectres d'origine (Fernandez Pierna, 2016).

- **Les prétraitements utilisés**

Trois prétraitements ont permis d'obtenir la meilleure discrimination possible :

Une SNV (Standard Normal Variate) permet de corriger les variations d'absorbance liées à la granulométrie des échantillons. Pour ce faire, l'absorbance moyenne des spectres est soustraite à l'absorbance de chaque spectre, puis, divisée par leur écart-type (Fernandez Pierna, 2016).

Une dérivée (Savitzky-Golay) permet la transformation des spectres afin de mettre en évidence les différences spectrales (Bertrand et Dufour, 2000). Le calcul de la dérivée des spectres par la méthode de Savitzky-Golay nécessite de fixer trois paramètres : le degré de la dérivée, le degré du polynôme et la taille de la fenêtre. Ces paramètres sont optimisés pour chaque propriété modélisée. Ils sont donc propres à l'étude menée et à la technique spectroscopique considérée (Laxalde, 2012).

Le troisième prétraitement appliqué dans le cadre de ce travail est l'autoscale. Ce dernier sert à centrer, pour chaque longueur d'onde, les valeurs puis à les diviser par leur écart-type (Wise et al., 2006).

6.2 Création des bibliothèques -calibration-validation- validation croisée

- **Création des bibliothèques**

En SPIR, les bibliothèques ont été réalisées à partir des spectres acquis de 30 échantillons, à raison d'un spectre par échantillon et 3 répétitions de la mesure. Les bibliothèques sont donc constituées de 90 spectres. En NIRM et NIR-HSI, deux types de bibliothèques ont été élaborées : une bibliothèque composée des spectres moyens et une autre qui comprend tous les spectres de particules. Pour ces derniers, en NIRM, chaque spectre correspond à point de mesure et en NIR-HSI, chaque pixel est représenté par spectre. Les bibliothèques sont ainsi constituées de milliers de spectres auxquels ont été enlevés au préalable, ceux correspondant au « background ».

- **Calibration- validation**

Pour construire un modèle et tester sa robustesse, il faut un set de calibration et un set de validation. Le set de calibration permet de construire le modèle. Ce dernier est ensuite appliqué sur le set de validation, afin de soupeser sa capacité à prédire correctement les données. En SPIR, on disposait uniquement du set de calibration composé de 90 spectres. En NIRM et NIR-HSI, les spectres moyens ont servi de set de calibration tandis que tous les spectres de particules ont permis de valider le modèle.

- **Validation croisée**

La validation croisée permet d'isoler chaque échantillon consécutivement pour valider le modèle (Bertrand et dufour,2000). La validation croisée appliquée est le « leave one out »

6.3 Modèle de discrimination (PLS-DA)

L'analyse des matrices de confusion, de calibration, de validation croisée et de prédiction permettent d'évaluer le modèle de discrimination. Pour notre étude, 2 classes ont été définies en vue de la création du modèle : l'ergot pur et les farines de céréales. Le modèle construit est « ergot pur contre les farines ». Dans la table de confusion qui est en réalité une matrice de confusion organisée différemment, on retrouve les classes à discriminer à savoir : l'ergot pur et les farines.

Dans la matrice de confusion, on peut observer 4 types de prédiction :

- Les échantillons de la classe considérée que le modèle prédit comme tel « true positive (TP) »
- Les échantillons qui n'appartiennent pas à la classe considérée mais prédits comme y appartenant par le modèle « False positive (FP) »
- Les échantillons qui n'appartiennent pas à la classe considérée mais prédits comme appartenant à la classe par le modèle « true negative (TN) »
- Enfin, les échantillons de la classe considérée, mais qui ne sont pas prédits comme y appartenant par la modèle « false negative (FN) »

Lorsque les valeurs de TP et TN sont égales à 1, pour la calibration et la validation croisée on peut conclure que le modèle prédit correctement les échantillons.

6.4 Modèle de calibration (PLS)

Le coefficient de détermination (R^2), est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression. Il mesure l'adéquation entre le modèle et les données observées. Sa valeur est comprise entre 0 et 1. Il est défini comme la part de variance expliquée par rapport à la variance totale (Laxalde, 2012). Si R^2 vaut 1, le modèle prédit correctement nos données.

$$R^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \text{ (Govaerts, 2016)}$$

\bar{y} Valeur moyenne mesurée sur tous les échantillons
 y_i Valeur mesurée sur un échantillon

L'erreur quadratique moyenne de calibration (RMSEC, Root Mean Squared Errors of Calibration), permet d'évaluer la performance du modèle selon les échantillons qui ont été utilisés pour la calibration. Pour qu'un modèle soit performant, la valeur du RMSEC devrait être la plus petite possible. Se fier uniquement sur le RMSEC pour évaluer la performance d'un modèle sous-estime son erreur, car ce sont les mêmes échantillons qui sont utilisés à la fois pour bâtir le modèle et l'évaluer (Demers, 2011).

$$RMSEC = \frac{1}{n - A - 1} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad y_i \text{ Valeur de référence observée (à prédire)}$$

A Nombre de variable latente

n Nombre d'échantillon de l'étalonnage

\hat{y}_i Valeur prédite pour l'échantillon

L'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV, root mean square error of cross validation), peut être exprimée en pourcentage de variance. Ce paramètre est obtenu à partir du set de calibration. Il est corrélé au nombre de variables latentes ; lorsque le nombre de variable latente est élevé, la RMSECV diminue (Chen et al., 2012).

$$RMSECV = \frac{1}{n - A - 1} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

L'exactitude de la régression peut être évaluée sur des échantillons n'ayant pas participé à l'étalonnage, par la racine carrée de l'erreur quadratique (RMSEP, root mean square error of prediction). Si le modèle a été correctement établi, les deux valeurs RMSEP et RMSEC doivent être voisines (Bertrand, 2002).

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

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie est divisée en plusieurs sous-parties. Dans un premier temps, l'analyse portera sur les résultats obtenus en spectroscopie proche infrarouge, microscopie proche infrarouge et imagerie proche infrarouge. Une comparaison des résultats obtenus par ces méthodes sera effectuée afin de définir la plus performante pour la détection de particules d'ergot dans les farines de céréales. Enfin, les résultats d'une toute autre approche, la microscopie optique, seront analysés de manière à évaluer les possibilités de cette méthode à répondre à notre problématique.

1. ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE (SPIR)

1.1 Résultats

1.1.1 Spectres des échantillons

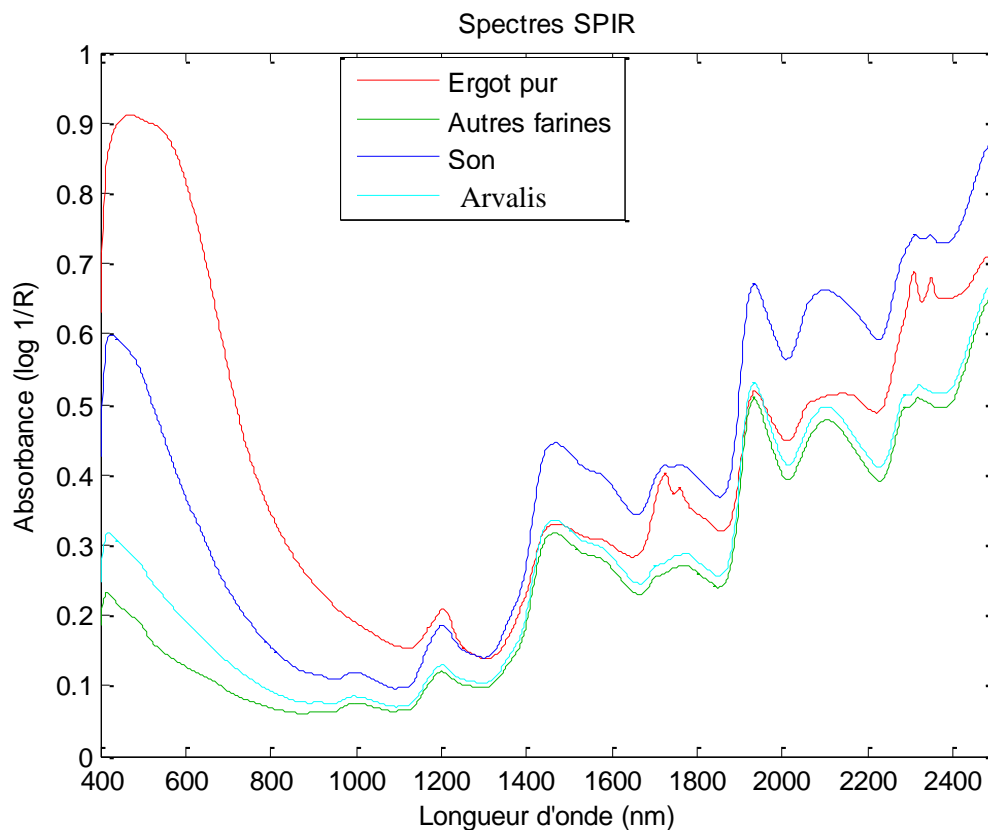


Figure 30 : Spectres proche infrarouge acquis avec le FOSS XDS

Comparaison des spectres moyens de l'ergot pur à ceux du son, des autres farines de céréales et des farines adultérées en ergot fournies par Arvalis dénommées (Arvalis).

La **figure 30** présente uniquement les profils de spectres moyens de 4 groupes d'échantillons. Cela permet de montrer une information qualitative, difficile à mettre en évidence lorsque les spectres de tous les échantillons sont considérés. Le spectre de l'ergot est caractérisé par la présence des doubles pics lipidiques aux longueurs d'onde suivantes : 1734 nm, 1765 nm, 2304 nm et 2348 nm. L'ergot est essentiellement constitué de mycélium, riche en lipides. La proportion en lipides du sclérote est de 20 à 40 % de sa masse (Jean, 2009). Le spectre du son a un profil assez proche de celui de l'ergot mais les doubles pics sont beaucoup moins prononcés. Les profils spectraux des autres farines et des farines adultérées en ergot (Arvalis) sont très similaires. Lorsqu'on considère uniquement la gamme de longueurs d'onde du visible (400-780 nm), on remarque que l'absorbance est plus importante pour le son et l'ergot. Parmi les échantillons analysés en SPIR, seul l'ergot et le son ont une couleur foncée. Or, le visible a une grande importance pratique pour la caractérisation de la couleur des denrées alimentaires (Bertrand, 2000). Plus un composé est foncé, plus il absorbe.

1.1.2 Analyse exploratoire

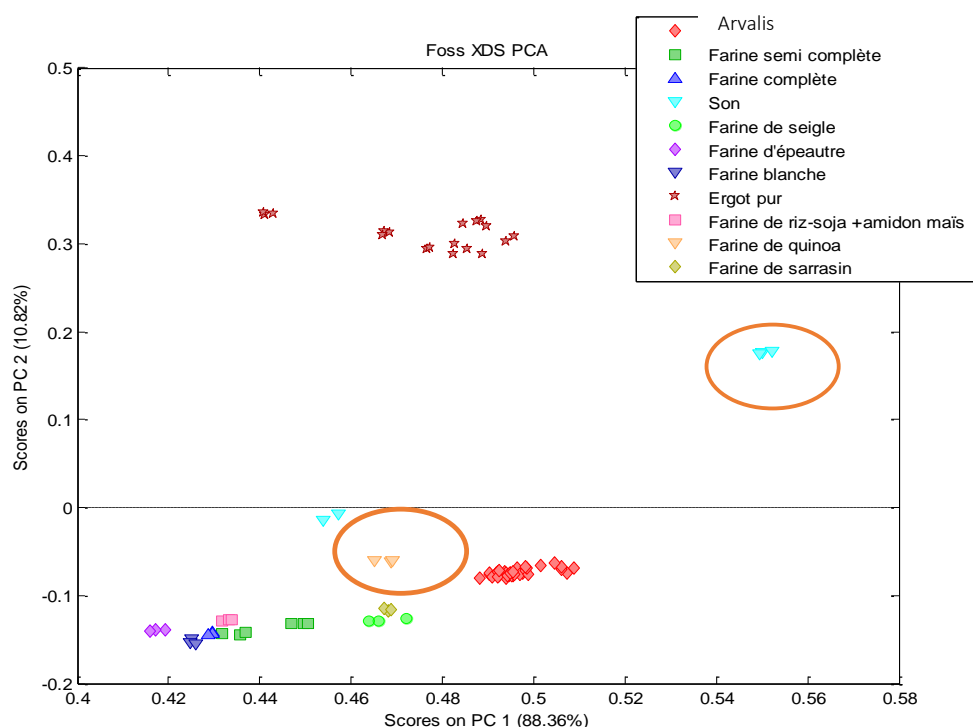


Figure 31 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 30 échantillons obtenus avec le FOSS XDS. Score PC1/PC2. Les spectres sont prétraités avec une SNV et une dérivée (15,2,1). On observe une bonne discrimination des spectres de particules d'ergot pur des autres particules. La composante principale 1 (PC1) explique 88,36 % de variabilité et la composante principale 2 (PC2) explique 10,82 % de variabilité.

L'analyse en composante principale est une méthode exploratoire. Elle permet d'avoir une première approche quant à la discrimination de l'ergot dans les farines de céréales.

On observe deux groupes sur cette PCA : un groupe formé par l'ergot pur, discriminé des autres échantillons essentiellement par la PC2 (scores élevés). Les scores élevés en PC1 permettent de discriminer les farines adultérées en ergot (Arvalis) des farines sans ergot (scores PC1 faibles). Un échantillon de son, sur les deux présents dans notre set, ne se retrouve dans aucun des groupes, il s'agit du son de blé. Plusieurs informations peuvent être tirées de cette analyse exploratoire :

- Une discrimination de l'ergot des farines de céréales semble possible par spectroscopie proche infrarouge. Le profil spectral de la **figure 30** permet d'expliquer en partie, ce que l'on observe au niveau de la PCA par rapport au son. En effet, le spectre moyen du son est assez proche de celui de l'ergot pur. Cela laisse penser qu'il aurait des caractéristiques similaires à celles de l'ergot. Lorsqu'on s'intéresse dans un premier temps, à la composition chimique de tous les échantillons de farines de céréales, le son d'avoine, la farine de quinoa et le son de blé ont les teneurs en matière grasse les plus élevées avec respectivement 7 %, 6,5 % et 4,7 %. Pour les autres farines, la teneur en matière grasse est autour de 1 à 3 %. Si maintenant, on s'intéresse à la couleur de ces farines, le son de blé est l'échantillon le plus foncé **figure 15**. L'échantillon de son qui tend vers le groupe formé par l'ergot pur est le son de blé. Il est mis en évidence sur la **figure 31**.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la position du son de blé dans la PCA :

- Cette observation pourrait être due à une contamination de l'échantillon de son de blé liée à une erreur de manipulation.
- La couleur peut être à l'origine de la configuration adoptée par cet échantillon. La PC2 discrimine les échantillons en fonction de la couleur entre 400 et 780 nm **figure 32**. Compte tenu de la couleur foncée du son de blé et de sa configuration, cette hypothèse explique effectivement la position de ce dernier au sein de la PCA. De plus, parmi tous les échantillons utilisés, l'ergot et le son de blé sont ceux qui ont la couleur la plus foncée. Il est à noter que ces observations sont faites sur base de deux échantillons. Il faudrait donc un grand nombre d'échantillons de son de blé et d'avoine. Cela permettrait de justifier si l'observation faite par rapport au son de blé est une réelle tendance ou une erreur.

On remarque sur cette PCA que les échantillons de farines de céréales les plus concentrés en matière grasse ne forment pas tout à fait un bloc avec les autres farines. Ils ont tendance à se rapprocher du groupe formé par l'ergot pur. C'est le cas pour le son de blé, le son d'avoine et la farine de quinoa mise en évidence dans la **figure 31**. Enfin, pour les mélanges d'Arvalis, on s'attendait à voir un rapprochement des échantillons les plus concentrés en ergot (1,27 % et 2,60 %) vers le groupe « ergot pur ». Ce n'est pas ce qu'on observe. Il est à noter que pour les analyses en SPIR, contrairement aux autres méthodes qui seront présentées dans cette partie, on obtient un spectre par échantillon. Il est donc difficile d'avoir plus d'informations qualitatives avec de si faibles concentrations. Toutefois, le résultat de la PCA obtenu avec cette méthode tend vers l'idée d'une discrimination possible de l'ergot dans les farines de céréales.

- **Interprétation des loadings**

Les différences importantes sont expliquées par les longueurs d'onde suivantes **figure 32** : 1190 nm, 1440 nm, 1734 nm, 1900 nm, 1940 nm, 1980 nm, 2110 nm, 2180 nm, 2304 nm, 2348 nm et 2461 nm. Le **tableau 9** affiche les bandes d'absorbance liées à ces longueurs d'onde. Les bandes à 1440 nm et à 1940 nm (pics les plus intenses) que l'on retrouve uniquement sur les loadings de la PC1 **figure 32**, sont caractéristiques de l'eau. Elles permettent d'expliquer la discrimination des farines adultérées en ergot (Arvalis). Tandis que pour la PC2, ce sont les pics de lipides à 1734 nm, 2304 nm, 2348 nm et du visible entre 400 et 780 nm qui sont les plus intenses. Ils permettent ainsi d'expliquer sur quels critères l'ergot est discriminé des farines.

Tableau 8 : Caractéristiques des bandes spectrales mises en évidence lors de l'analyse PCA (Bertrand, 2002 ; Bertrand et Dufour, 2000 ; Osborne and Fearn, 1986)

Longueur d'onde (nm)	Structure caractéristique	Liaison et nature de la vibration
1190	Non identifiée	Elongation C-H 2 ^{ème} harmonique
1440	Eau	O-H 1 ^{ère} harmonique
1734	Lipides	Combinaison élongation C-H + Déformation C-H
1900	Amidon	Elongation O-H+ Elongation C-O- C-O
1940	Eau	Elongation O-H + Déformation O-H
1980	Protéines	Elongation asymétrique N-H + amide II
2110	Non identifiée	Elongation symétrique N-H + amide III
2180	Protéines	Amide I - amide I + amide III
2304	Lipides	Combinaison élongation C-H + déformation C-H
2348	Lipides	Elongation symétrique H-C-H + =CH ₂ Déformation
2461	Amidon	Elongation C-H + Elongation de C

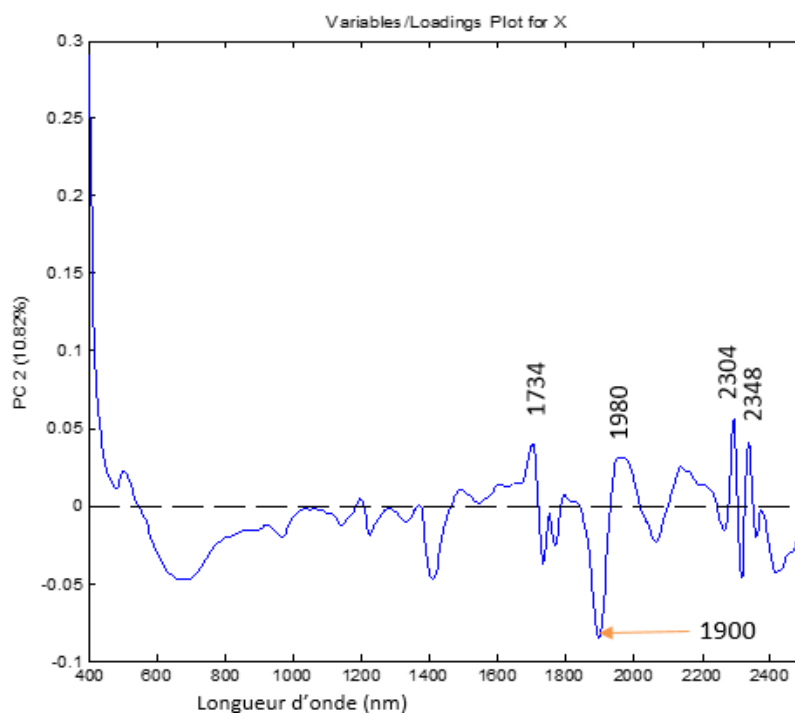
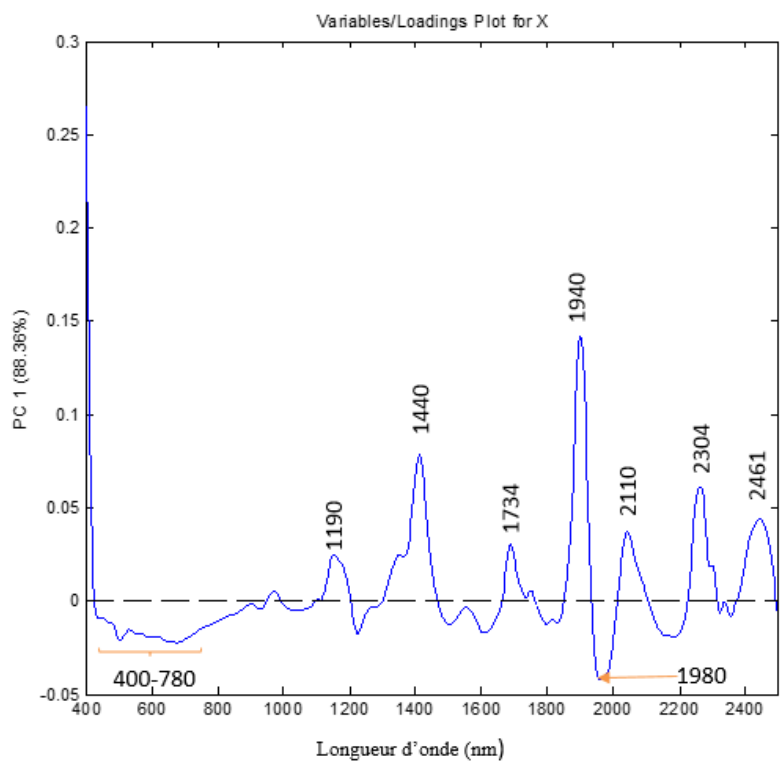
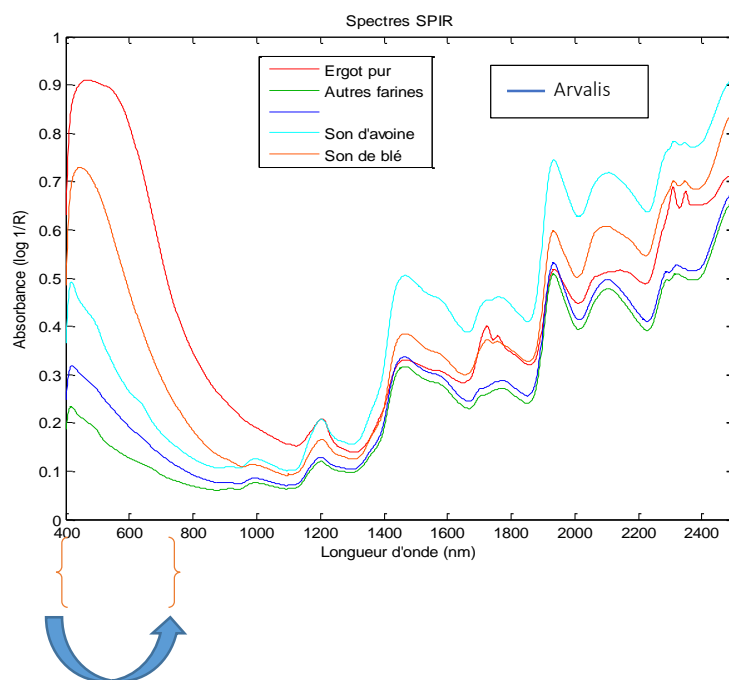


Figure 32 : Loadings PC1/PC2, de l'analyse en composante principale réalisée sur les spectres de 30 échantillons obtenus avec le FOSS XDS. Sur cette figure, on peut voir les différentes longueurs d'onde qui permettent d'expliquer la discrimination de l'ergot par rapport aux échantillons de farine.



Longueurs d'onde d'intérêt

Figure 33 : Spectres proche infrarouge acquis avec le Foss XDS

Comparaison du spectre de l'ergot pur aux spectres du son d'avoine, du son de blé, des farines adultérées en ergot fournies par Arvalis et des autres farines de céréales.

Pour la **figure 33**, on va s'intéresser uniquement à l'analyse des absorbances dans le visible.

Entre 400 et 780 nm, l'ergot pur et le son de blé sont parmi tous les échantillons analysés, ceux qui absorbent le plus. Ces échantillons sont aussi ceux ayant une couleur très foncée. Or, la gamme de longueurs d'onde du visible permet de caractériser de nombreuses molécules qui présentent des doubles liaisons conjuguées. Elle est aussi d'un grand intérêt pratique pour la caractérisation de la couleur des denrées alimentaires (Bertrand, 2000). Cette bande permet donc d'expliquer, en partie, la discrimination de l'ergot pur des autres échantillons et pourrait peut-être expliquer le rapprochement du son de blé vers le groupe « ergot pur » au niveau de la PCA.

1.1.2 Modèle de classification

Pour discriminer l'ergot des farines de céréales, un modèle PLS-DA a été construit sur base des observations faites lors de l'analyse exploratoire.

Pour ce faire, deux classes ont été réalisées : une première classe « ergot pur » qui est composée de 6 échantillons et une deuxième classe, « farines de céréales », avec 11 échantillons.

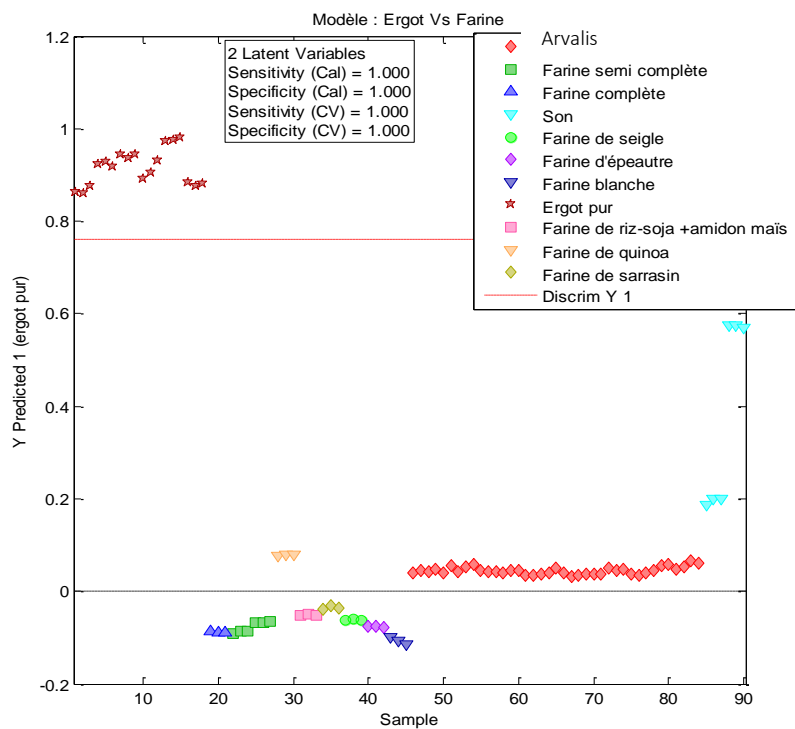


Figure 34 : Valeur prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » réalisé avec le set de spectres acquis avec le FOSS XDS. On remarque une bonne discrimination des spectres de l’ergot pur des autres spectres. Pour réaliser ce modèle, les spectres sont prétraités avec une SNV et une dérivée (15,2,1). La validation croisée appliquée est « leave-one-out »

Plusieurs observations peuvent être faites par rapport à ce modèle :

- La sensibilité et la spécificité pour chacune des classes de ce modèle, aussi bien pour la calibration et la validation croisée semble parfaite. En effet, la valeur « 1 » obtenue pour tous ces paramètres porte à croire qu’il n’y a pas d’erreur dans ce modèle (Wise et *al.*, 2006).
- Le modèle permet une bonne discrimination de l’ergot pur des autres échantillons. On remarque effectivement que seul l’ergot pur se trouve au-delà du seuil de discrimination (Y1).
- Le son de blé, le son d’avoine, les farines adultérées en ergot (Arvalis) et la farine de quinoa sont séparés des autres farines et tendent vers le seuil de discrimination. Cette analyse peut être corrélée avec les observations faites pour la **figure 31**.

Toutefois, il faudrait appliquer un set d'analyse pour valider le modèle. Ce dernier permet d'évaluer la robustesse et la fiabilité du modèle. Nous ne disposons malheureusement pas pour les analyses en SPIR, d'un set de spectres pour validation du modèle.

1.2 Discussion

Une étude réalisée par Vermeulen et al., (2009) sur la détection des sclérotés dans les céréales (échantillons non broyés) par spectroscopie proches infrarouge a montré qu'il est possible de détecter l'ergot dans les céréales. Pour ce faire, une SNV et une dérivée (15,2,1) ont été appliquées en prétraitement (Vermeulen et al., 2009). Nous sommes arrivés à la même conclusion dans ce mémoire, avec un prétraitement identique, mais en travaillant avec des poudres autrement dit, avec des échantillons broyés.

2. Analyse par microscopie proche infrarouge (NIRM)

2.1 Résultats

2.1.1 Spectres moyens des échantillons

La **figure 35** regroupe les spectres moyens de l'ergot pur, de son, des autres farines de céréales et les farines adultérées avec des teneurs en ergot de 0 % à 2,60 % (Arvalis). Les observations faites pour la **figure 30**, par rapport à ces échantillons sont réitérées pour l'analyse en NIRM. La **figure 36**, montre les spectres moyens des mélanges farine-ergot, de différentes proportions. Pour le mélange avec 50 % de teneur en ergot pur, on voit les doubles pics caractéristiques des lipides. Ces derniers sont beaucoup moins visibles pour les mélanges avec des teneurs en ergot moins importantes.

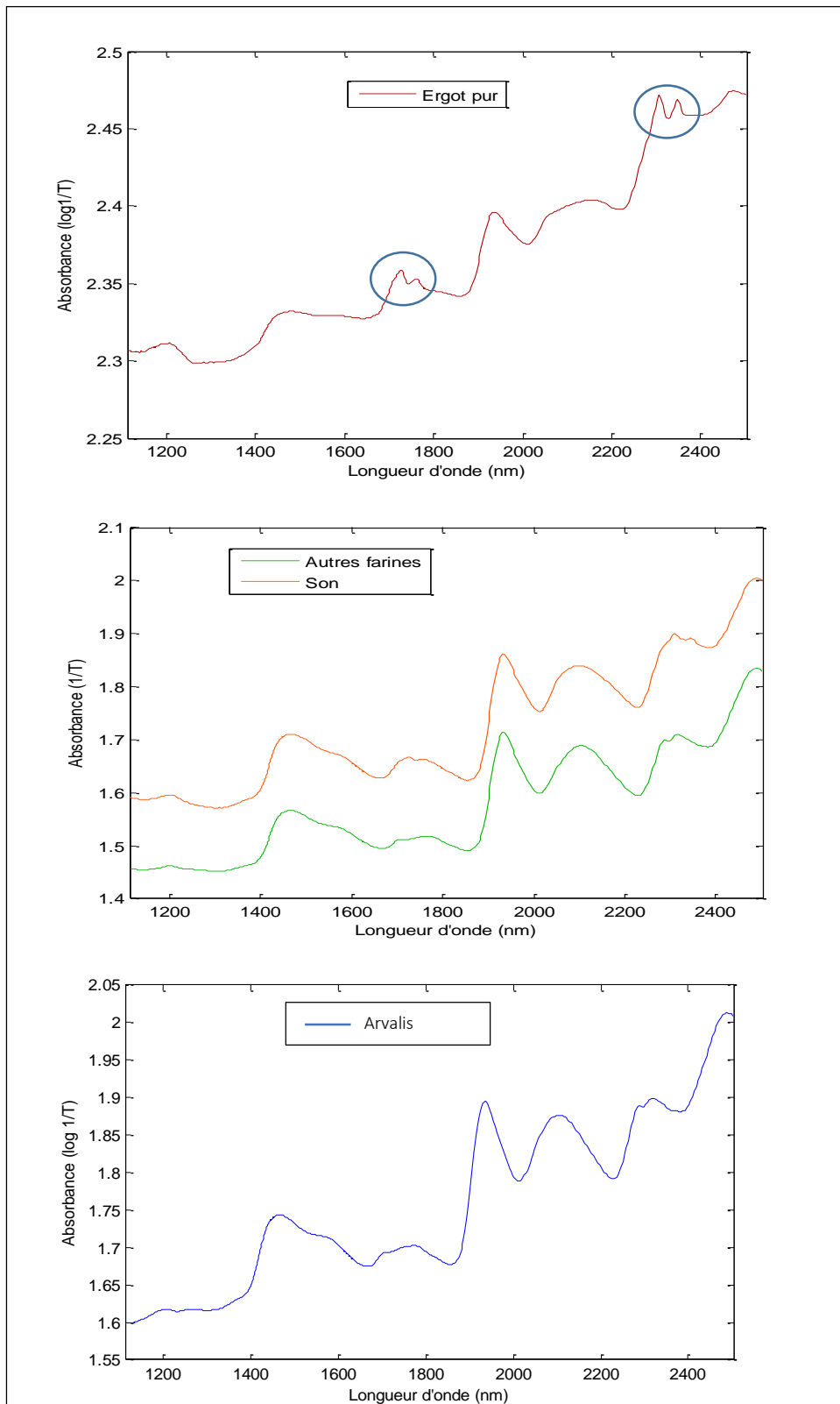


Figure 35 : Spectres moyens en microscopie proche infrarouge acquis avec le Bruker Hypérion 3000

Comparaison du spectre moyen de l'ergot pur à celui du son, des autres farines et des farines adultérées en ergot fournies par Arvalis.

Spectres NIRM

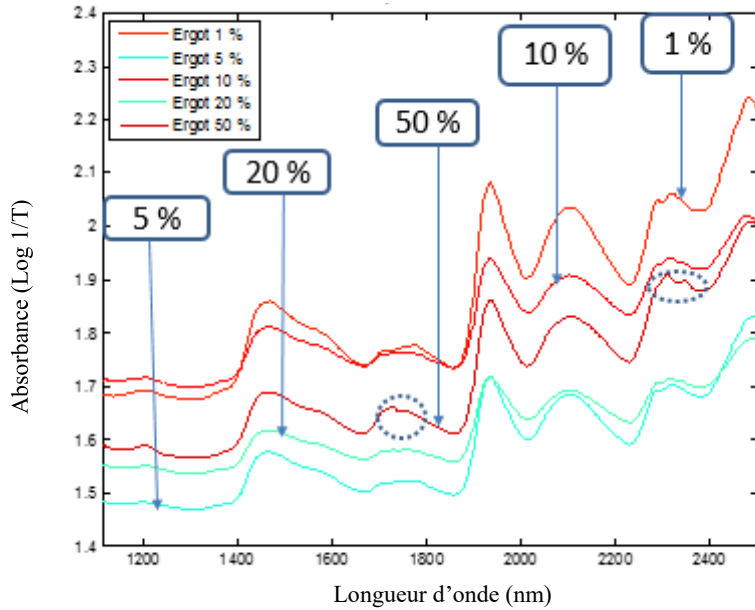


Figure 36 : Spectres moyens des mélanges farine-ergot pur en microscopie proche infrarouge acquis avec le Bruker Hypérior 3000.

2.1.2 Analyse exploratoire

- PCA sur les spectres moyens

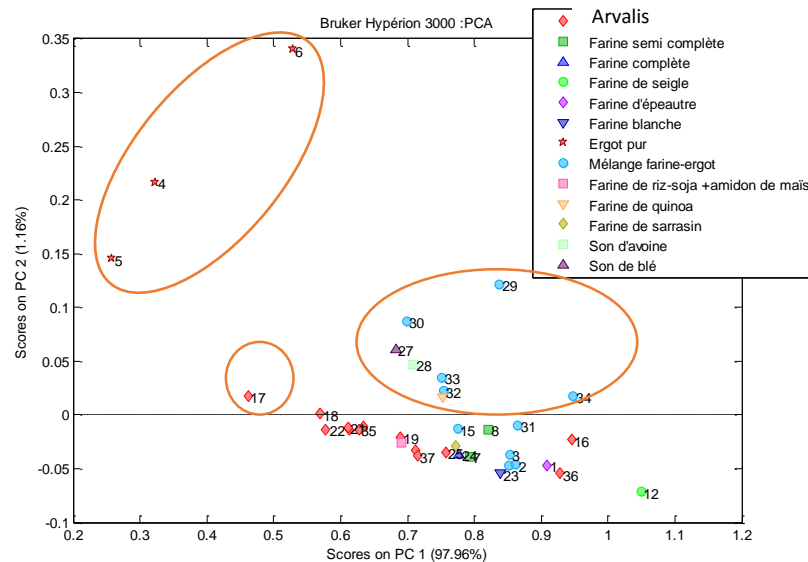


Figure 37 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres moyens de 37 échantillons acquis avec le Bruker Hypérior 3000. Score PC1/PC2. Les spectres sont prétraités avec une SNV et une dérivée (15,2,1). On observe une bonne discrimination des spectres de particules d'ergot pur des autres spectres. La composante principale 1(PC1) explique 97,96 % de variabilité tandis que la composante principale 2 (PC2) explique 1,16 % de variabilité.

L'analyse NIRM comprend des échantillons de mélange farine-ergot de différentes proportions, qui n'ont pas été analysés en SPIR.

Nous ne disposions pas de suffisamment d'échantillons pour réaliser ces mélanges. Par ailleurs, nous n'avons pas pris des mesures avec des échantillons d'ergot pur de granulométrie supérieure à 1000 μm . On obtient difficilement des spectres de bonne qualité avec de grosses particules en NIRM.

Plusieurs observations peuvent être faites sur la PCA réalisée avec les spectres moyens :

- On discrimine très bien l'ergot pur des autres échantillons de farines. Il forme un groupe à part, mis en évidence sur la **figure 37**.
- Les farines de céréales les plus riches en matière grasse : le son de blé, le son d'avoine et la farine de quinoa convergent vers le groupe « ergot pur ». Les mélanges farine-ergot les plus concentrés en ergot, tendent aussi vers le groupe « ergot pur ». Tous ces points sont mis en évidence sur la **figure 37**.
- Le mélange de farines adultérées (Arvalis) le plus concentré en ergot, tend vers le groupe « ergot pur » point 17 sur la **figure 37**.
- Les mélanges farine-ergot et farines adultérées (Arvalis), de faibles concentrations en ergot sont groupés avec les autres farines de céréales.

L'analyse exploratoire des spectres moyens en NIRM, montre qu'il est possible de discriminer l'ergot des farines de céréales. Elle permet aussi d'obtenir plus d'informations qualitatives en comparaison à l'analyse en SPIR. Notamment, pour les mélanges de farines adultérées en ergot (Arvalis), pour lesquels il était difficile d'observer une différence entre les échantillons les plus concentrés en ergot (2,60 %) et les moins concentrés en ergot (0 %).

• **Interprétation des loadings**

Les différences importantes observées sur l'analyse en composante principale de la **figure 37** sont expliquées par les longueurs d'onde suivantes **figure 38** : 1440 nm, 1734 nm, 1940 nm, 1980 nm, 2050 nm, 2304 nm et 2461 nm. L'ergot est discriminé de tous les échantillons essentiellement par la PC2. Les longueurs d'onde associées sont caractéristiques des lipides (1734 nm et 2304 nm avec les pics les plus intenses) **figure 38**. La PC1 permet de discriminer les échantillons de mélange avec les teneurs les plus élevées en ergot ainsi que les farines avec des concentrations en matière grasse les plus importantes, des autres farines. Les longueurs d'onde associées sont : la longueur d'onde de l'eau à 1940 nm avec le pic le plus intense, elle permet d'expliquer en grande partie la séparation permise par la PC1. On a aussi une longueur d'onde caractéristique des lipides à 2304 nm, moins intense que celle de l'eau. Elle est liée aux mélanges farine-ergot avec une teneur en ergot importante.

Autrement dit, elle est liée à une teneur en lipides élevée. Elle permet aussi d'expliquer la configuration adoptée par les farines riches en matière grasse.

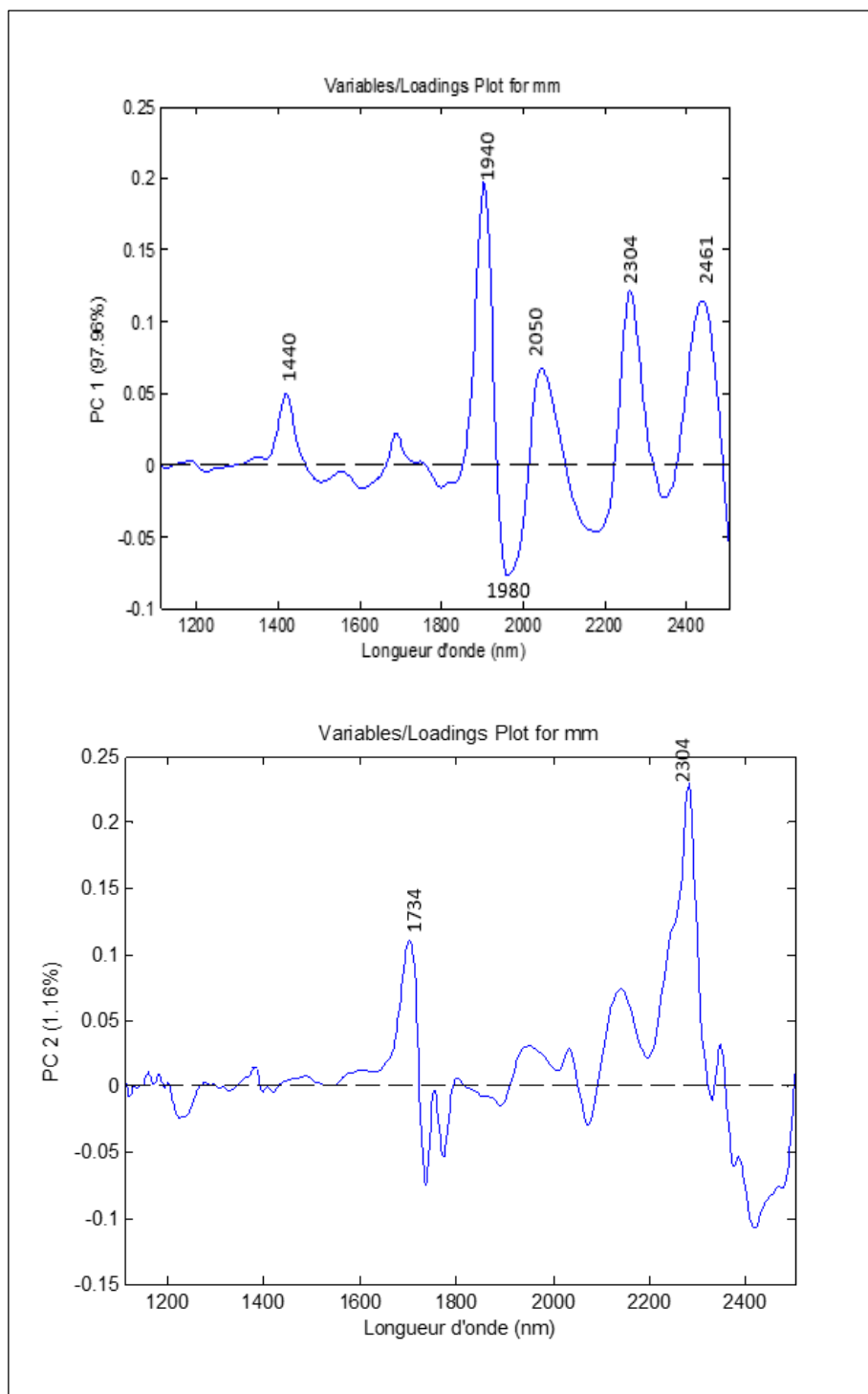


Figure 38 : Loadings PC1/PC2, de l'analyse en composante principale réalisée sur les spectres moyens de 37 échantillons obtenus avec le Bruker Hypérior 3000.

Sur ce graphique, on peut voir les différentes longueurs d'onde qui permettent d'expliquer la discrimination de l'ergot pur des autres échantillons de farine.

Tableau 9 : Caractéristique des bandes spectrales mises en évidence lors de l'analyse PCA
(Bertrand, 2002 ; Bertrand et Dufour, 2000 ; Osborne and Fearn, 1986)

Longueur d'onde (nm)	Structure caractéristique	Liaison et nature de la vibration
1440	Saccharose/Amidon	Elongation harmonique O-H 1 ^{ère}
1734	Lipides	Elongation harmonique C-H 1 ^{ère}
1940	Eau	Elongation déformation O-H + O-H
1980	Protéines	Elongation asymétrique N-H + amide II
2050	Protéines	Elongation asymétrique N-H + amide II
2304	Lipides	Combinaison élancement C-H + Déformation C-H
2461	Amidon	Elongation C-H + Elongation C-C

- **PCA sur le set de spectres de particules**

- On voit sur la **figure 39**, la discrimination des spectres de particules d'ergot pur des autres spectres.
- On retrouve quelques points de mesure du mélange farine-ergot au sein de ceux de l'ergot pur. Ce sont les spectres de particules avec une teneur en ergot élevée **figure 40**. Un point de mesure de farines adultérées en ergot (Arvalis) avec une teneur de 2,60 % **annexe 1** est présent dans l'ergot pur **figure 40**. Pour les farines de céréales, les spectres de particules du son d'avoine, du son de blé et de farine de quinoa se rapprochent de ceux de l'ergot pur. La configuration de ces céréales au niveau de la PCA semble due à leur composition chimique **tableau 4**.

En effet, ce sont des farines de céréales avec une teneur en matière grasse la plus élevée que l'on retrouve près de l'ergot pur.

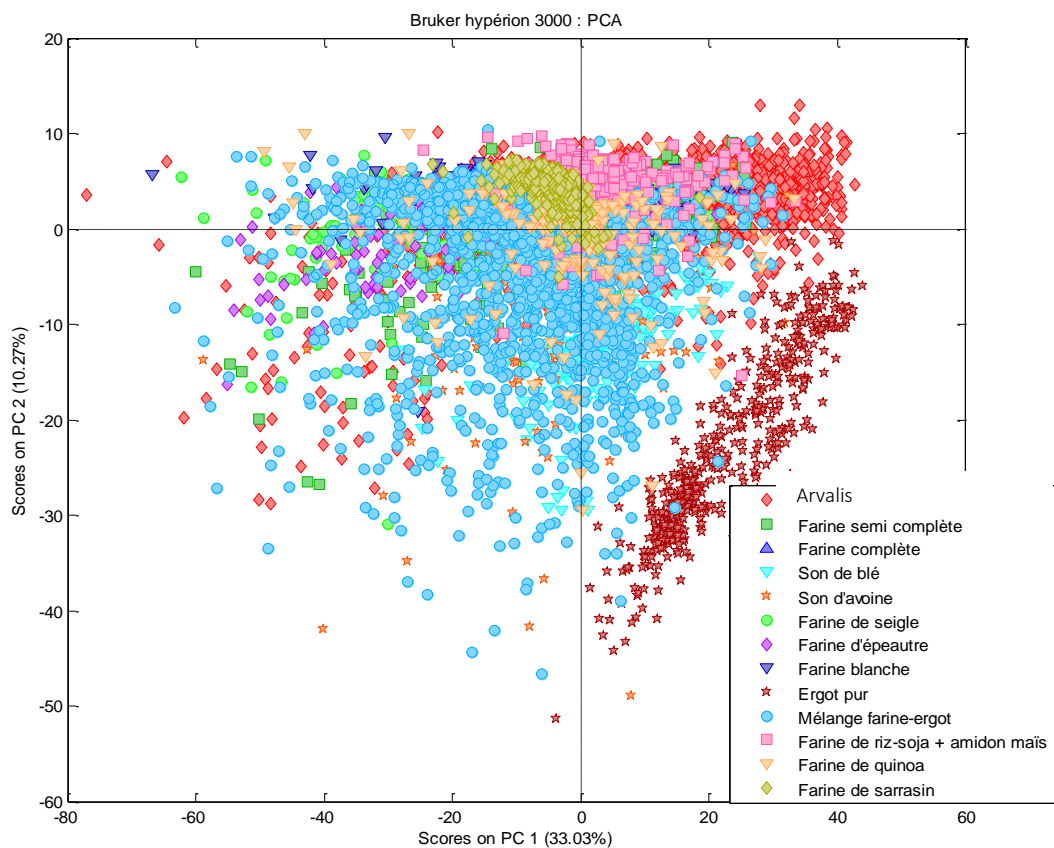


Figure 39 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 37 échantillons acquis avec le Bruker hypérion 3000. Scores PC1/PC2. Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivée (15,2,1) et un autoscale. On observe une bonne discrimination des spectres de particules d'ergot pur des autres spectres. La composante principale 1 (PC1) explique 33,03 % de variabilité et la composante principale 2 (PC2) explique 10,27 % de variabilité.

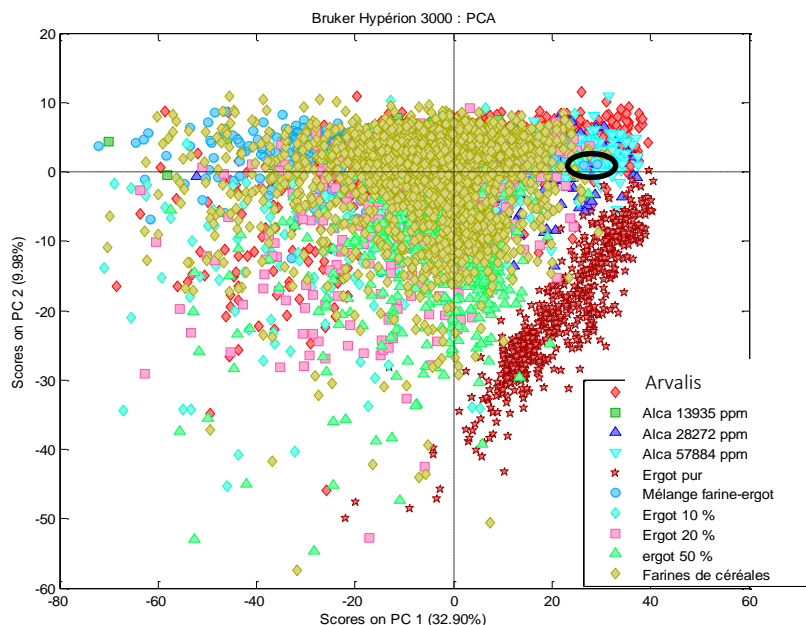


Figure 40 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de 37 échantillons acquis avec le Bruker Hypérion 3000. Score PC1/PC2 Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivative (15,2,1) et un autoscale. On observe une bonne discrimination des spectres de particules d’ergot pur des autres spectres. La composante principale 1 (PC1) explique 32,90 % de variabilité et la composante principale 2 (PC2) explique 9,98 % de variabilité.

Alca = Alcaloïdes

La **figure 40** met en évidence les spectres de particules de mélanges, les plus concentrés en ergot que l’on retrouve dans le groupe formé par « l’ergot pur ».

Pour les mélange farine–ergot, on voit quelques spectres de particules avec une teneur en ergot de 50 %, 20 %, et 10 % dans le groupe formé par « l’ergot pur ». La même observation peut être faite pour les farines adultérées en ergot (Arvalis). Pour ces dernières, un spectre de l’échantillon le plus concentré en ergot (2,60 %) avec une teneur en alcaloïde de 57884 ppm (Alca 57884 ppm) est présent dans le groupe « ergot pur ».

Pour ces deux mélanges, farine-ergot et Arvalis, les échantillons ayant une faible concentration en ergot adoptent différentes configurations :

- Soit, ils sont groupés avec les farines de céréales.
- Soit, ils se rapprochent du groupe « ergot pur ».
- Soit, ils sont regroupés entre échantillons de différents mélanges.

C'est notamment le cas pour les échantillons avec une teneur en ergot de 5 % et 1 % pour lesquelles on retrouve quelques points de mesure au sein des spectres de particules des farines adultérées (Arvalis) avec une teneur en ergot de 2,60 % (Alca 57884 ppm). (rond noir sur la **figure 40**)

La dispersion observée des échantillons de mélanges est liée à la prise de mesure. En effet, lors de l'analyse, le rayon infrarouge peut atteindre soit une particule de farine, soit une particule d'ergot pur, soit un mélange des deux. On obtient donc respectivement, soit un spectre de farine qui se retrouve dans le groupe « farines de céréales », soit un spectre d'ergot pur, qui sera rattaché au groupe « ergot pur » soit un spectre de mélange farine et ergot pur, qui ne sera présent dans aucun des groupes cités. Il est à noter que plus l'échantillon de mélange est concentré en ergot pur, plus la probabilité de trouver cet échantillon dans le groupe « ergot pur » est élevée.

2.1.3 Modèle de classification

Pour discriminer l'ergot des farines de céréales en NIRM, un modèle PLS-DA à partir des spectres moyens a été construit. Ce modèle s'appuie sur les observations faites lors de l'analyse exploratoire des spectres moyens et sur le set de spectres de particules. Pour ce faire, l'équation « Ergot contre les Farines » a été établie sur base de deux classes : une première classe « ergot pur » qui est composée de 3 échantillons et une deuxième classe « farines de céréales » avec 11 échantillons.

Tout comme en SPIR, deux variables latentes ont été utiles pour faire ce modèle **figure 41**.

On obtient des valeurs de paramètres identiques à celles de l'analyse en SPIR, pour le modèle en NIRM. Le modèle semble « parfait ». On obtient « 1 » pour tous les paramètres, autrement dit, ce modèle ne présente pas d'erreur. Toutefois, il est important de valider le modèle une fois construit, pour évaluer sa capacité à prédire correctement les échantillons.

Ce modèle est appliqué par la suite aux sets de spectres de particules des mélanges farine-ergot, mélanges Arvalis et aux farines de céréales.

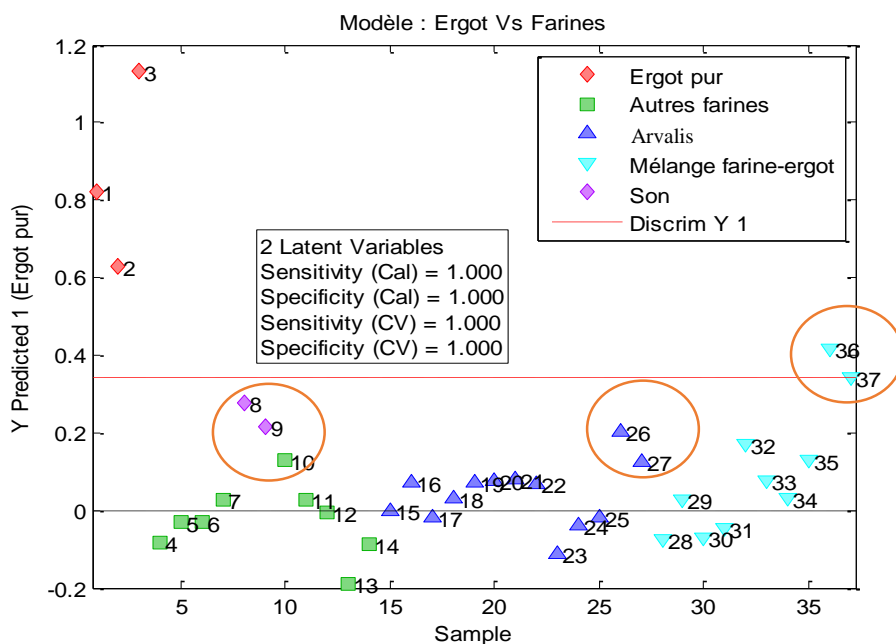


Figure 41 : Valeurs prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » réalisé sur les spectres moyens acquis avec le Bruker Hypérior 3000.

Pour réaliser ce modèle, les spectres ont été prétraités avec une SNV et une dérivée (15,2,1). La validation croisée appliquée est « leave-one-out »

Tableau 10 : Table de confusion validation croisée

		Classe réelle	
		Ergot	Farine
Classe Prédite	Ergot	3 (soit 100 %)	0 (soit 0 %)
	Farine	0 (soit 0 %)	11 (soit 100 %)

Ce tableau montre les prédictions des échantillons utilisés pour construire le modèle. Les trois échantillons d'ergot utilisés ainsi que les 11 échantillons de farines sont prédits comme tels. Le modèle réalisé à partir des spectres moyens semble correct.

Plusieurs informations sont obtenues à partir de la figure 41 :

- Les échantillons de mélanges avec une teneur en ergot la plus élevée, (points 36 et 37 qui correspondent respectivement à 20 % et 50 % en ergot) sont présents soit, sur la ligne de discrimination, soit au-dessus.
- On fait un constat similaire pour les échantillons adultérés en ergot provenant de chez Arvalis.

- Les échantillons les plus concentrés en ergot (points 26 et 27 qui correspondent respectivement à des teneurs en ergot de 1,27 % et 2,60 %) se rapprochent de la ligne de discrimination Y1.
- Enfin, les échantillons de farines de céréales les plus concentrés en matière grasse (Points 8, 9,10), qui correspondent respectivement au son de blé, au son d’avoine et à la farine de quinoa), tendent vers la ligne de discrimination Y1.

Toutes ces observations concordent avec celles des analyses exploratoires en NIRM. Il est à noter qu’un modèle peut aussi être construit à partir du set de spectres par particules **annexe 3**. Néanmoins, on utilise les spectres moyens pour le faire car ils permettent de réduire l’erreur.

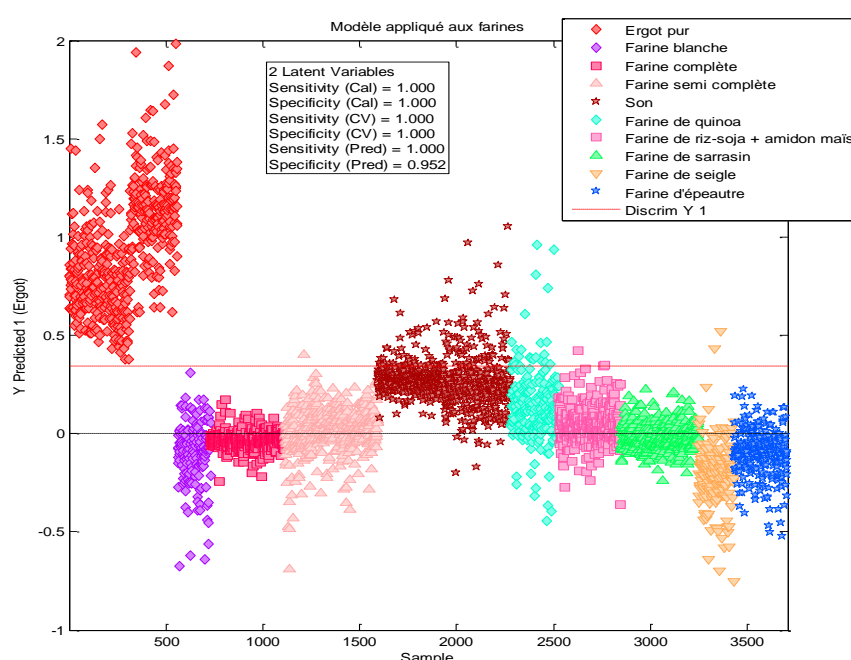


Figure 42 : Modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux farines de céréales

Le modèle est appliqué sur les spectres par particules de 11 échantillons de farines. Sur la figure, seules 9 farines sont apparentes car les deux échantillons de son (son de blé et son d’avoine) ont été regroupés en un seul échantillon de même que les deux échantillons de farine semi complète.

Tableau 11 : Table de confusion de validation croisée

		Classe réelle	
		Ergot	Farine
Classe Prédite	Ergot	561(soit 100 %)	2999 (soit 95,3%)
	Farine	0 (soit 0 %)	148 (soit 4,7 %)

La **figure 42**, montre la validation du modèle avec le set de spectres par particules des farines de céréales. On retrouve 8 échantillons de farines en-dessous de la ligne de discrimination.

Ce qui semble logique étant donné que ces échantillons de farines ne contiennent pas d'ergot et ont une très faible teneur en matière grasse. Toutefois, un certain nombre de spectres de son et de farine de quinoa, sont présents au-delà de la ligne de discrimination et sont donc prédits comme « ergot pur » à cause de leur teneur élevée en matière grasse comme c'est le cas pour l'ergot.

Le **tableau 11** présente la table de confusion de validation croisée, pour la validation du modèle avec le set de spectres par particules des farines. On a environ 5 % de spectres des échantillons de farine qui sont prédits comme « ergot pur ». Or, dans ces échantillons, on n'en dénombre aucun avec de l'ergot. Ce sont les échantillons particuliers (pur son et quinoa) avec une teneur élevée en matière grasse qui sont classés comme tels.

L'annexe 4 regroupe l'ensemble des prédictions obtenues pour le set de spectres par particules de farines appliqué au modèle « Ergot Vs Farines » **figure 42**. On note que ce sont les échantillons de son et la farine de quinoa qui ont le pourcentage de spectres prédits comme « ergot » le plus élevé. Les valeurs de prédictions sont : 17,64 % de spectres pour le son et 9,64 % pour la farine quinoa.

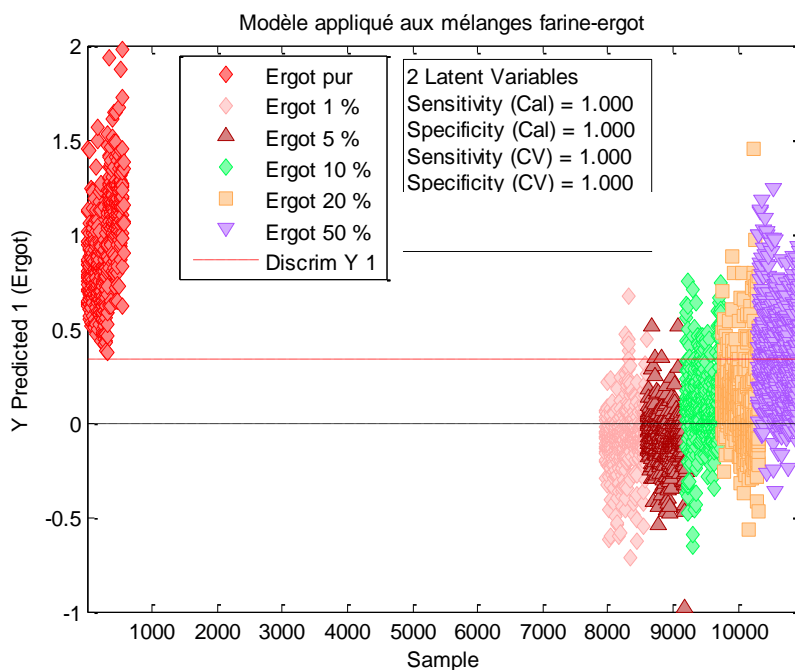


Figure 43 : Valeurs prédites par le modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux mélanges farine-ergot

La **figure 43** présente la validation du modèle réalisée à partir des spectres de particules des mélanges farine-ergot. On voit un gradient de concentration en ergot pour ces échantillons.

En effet, plus l'échantillon est concentré en ergot, plus il sera présent en quantité élevée au-delà de la ligne de discrimination et prédit comme « ergot pur ». Pour les échantillons avec 50 %, 20 % et 10 % de teneur en ergot pur, le modèle semble prédire ces teneurs comme telles. Cependant, pour les échantillons avec 5 % et 1 % de teneur en ergot pur, la prédiction devient difficile à évaluer. Il est important, après avoir observé ce graphique de valeurs prédites, de déterminer le pourcentage de spectres prédits comme « ergot » et de le comparer aux valeurs de référence **annexe 4**.

L'annexe 4 affiche les valeurs de prédiction de la teneur en ergot dans les mélanges farine-ergot. On observe plusieurs choses : les valeurs de prédiction à 1 %, 10 %, 20 % et 50 % de teneur en ergot sont du même ordre de grandeur que les valeurs de référence. La prédiction à 5 % est faible (0,69 %). Toutefois, lorsqu'on compare les spectres prédits comme « ergot pur » pour ce dernier (4 spectres) avec ceux obtenus pour le mélange à 1 % (7 spectres), on n'observe pas une grande différence. Cela permet d'expliquer pourquoi il est difficile de bien différencier ces deux échantillons sur la **figure 43**.

Les disparités entre les valeurs prédites et les valeurs de référence pourraient être dues à la préparation de l'échantillon de mélange. Lors de la préparation des échantillons de mélange de 5 % à 50 % de teneur en ergot, un tamis a été utilisé pour transférer les poudres d'ergot dans la farine en vue de réaliser le mélange. Or, pour le mélange avec une teneur de 1 %, la poudre d'ergot a été introduite directement dans la farine. Les particules d'ergot pourraient avoir été retenues en partie par le tamis. Autrement dit, la teneur réelle en ergot pour les échantillons de mélange de 5 à 50 % est inférieure aux valeurs définies pour l'analyse.

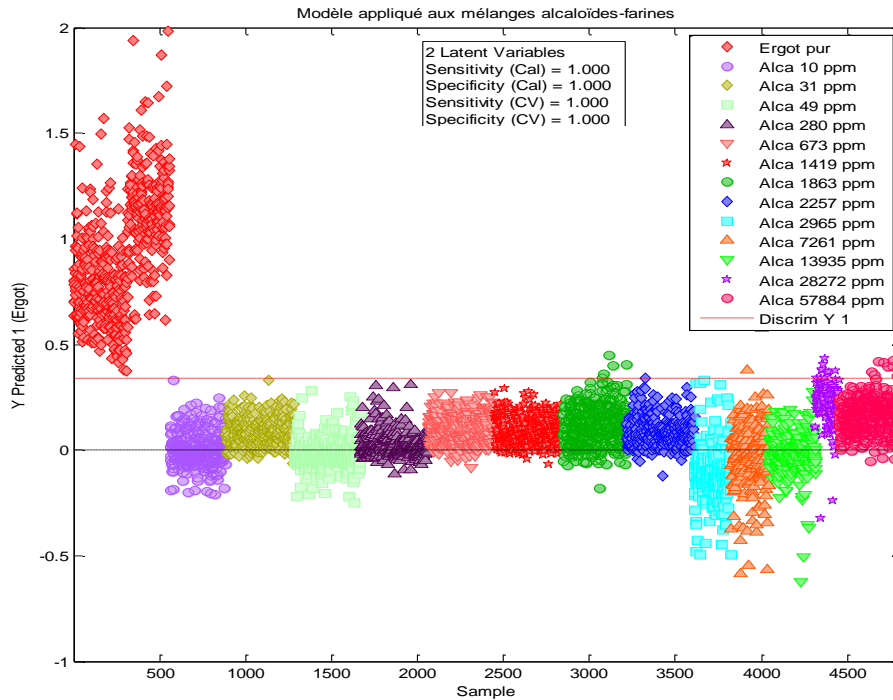


Figure 44 : Modèle « Ergot Vs Farines » appliqué aux farines adultérées en ergot fournies par Arvalis avec des teneurs en ergot de 0 % à 2,60 % dont les concentrations en alcaloïdes sont de 10 ppm à 57884 ppm.

La **figure 44** présente la validation du modèle à partir du set de spectres de particules des farines adultérées en ergot (Arvalis). Pour ces farines, on a de très faibles concentrations en ergot.

En effet, 11 échantillons sur les 13 analysés ont une concentration en ergot inférieure à 1 % **annexe 1**. Dix échantillons avec une teneur en ergot inférieure à 1 % semblent bien prédits. On les retrouve en-dessous de la ligne de discrimination Y1. Les échantillons avec une teneur en ergot de 1,27 % (Alca 28272 ppm) et 2,60 % (Alca 57884 ppm) semblent avoir des spectres prédits comme « ergot pur » à hauteur de la teneur considérée. Un échantillon avec une concentration en alcaloïdes (Alca 1863 ppm) soit 0.084 % de teneur en ergot montre également quelques spectres prédits comme ergot pur.

Lorsqu'on regarde les valeurs de prédiction obtenues **annexe 4**, on observe : 5,95 % de points de mesure pour l'échantillon (Alca 28272 ppm) sont prédits comme « ergot pur » et 2,23 % de points de mesure pour l'échantillon (Alca 57884 ppm) sont prédits comme « ergot pur ». Pour chacun de ces échantillons, 8 spectres sont prédits comme « ergot pur ». Cela semble cohérent étant donné qu'on a le même ordre de grandeur pour la teneur réelle en ergot. Or, si on analyse uniquement les points de mesure prédits comme « ergot », (Alca 28272 ppm) a un pourcentage plus élevé (5,95 %) car cet échantillon a un nombre total de spectres qui vaut environ 1/3 de

celui de l'échantillon (Alca 57884 ppm). Par conséquent, le pourcentage de spectres prédits comme « ergot » pour ces deux échantillons n'est pas un bon indicateur de prédiction.

Le modèle « Ergot Vs Farine » appliqué sur le set de spectres par particules des farines adultérées (Arvalis) semble bien prédire tous les échantillons excepté (Alca 1863 ppm).

On peut tenter d'expliquer cette incohérence par les hypothèses suivantes :

- On a pu voir sur la **figure 43**, qu'il est difficile d'évaluer la prédiction des échantillons avec une teneur en ergot de 5 % et 1 %. Etant donné que la teneur en ergot la plus élevée pour les échantillons de mélanges Arvalis est de 2,60 %, on se trouve donc confronté à la même difficulté pour prédire correctement les faibles teneurs en ergot.
- Le manque d'homogénéité de l'échantillon en relation avec l'échantillonnage.
- La teneur en ergot d'un lot ne permet pas d'estimer précisément la teneur en alcaloïdes du lot¹⁷.

La **figure 45** montre les valeurs de référence du pourcentage d'ergot en relation avec les valeurs prédites par le modèle PLS-DA appliqué sur les mappings de particules des mélanges farine-ergot et des farines adultérées en ergot provenant de chez Arvalis. On a un coefficient de détermination proche de 1 (0,98). Ce modèle semble donc prédire correctement les mélanges.

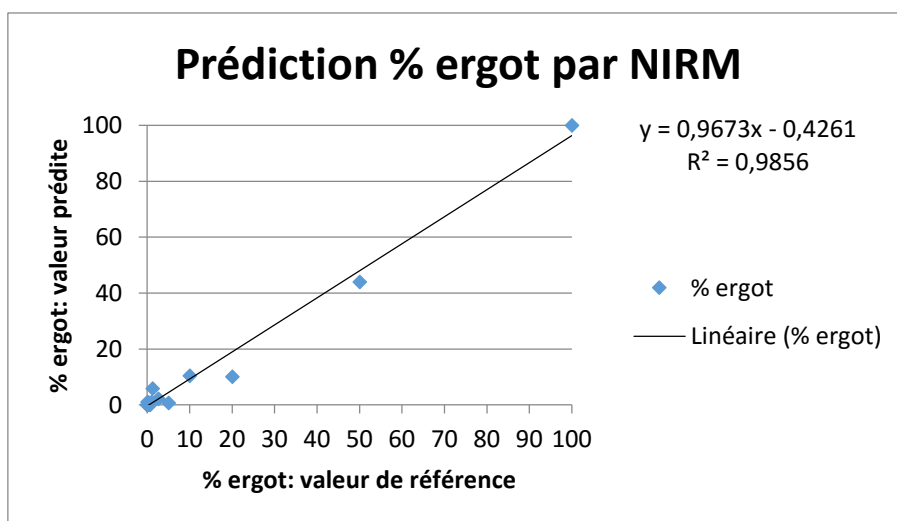


Figure 45 : Corrélation entre valeurs de références du pourcentage d'ergot et valeurs prédites par le modèle PLS-DA « Ergot Vs Farines » appliqué aux mélanges farine-ergot et farine adultérées en ergot (Arvalis)

¹⁷ http://www.evenements-arvalis.fr/reunion-techniciens-le-20-novembre-2015-avignon-84--@/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.html?id=36091&prop=file

2.1.4 Modèles de calibration

Les modèles de calibration ont été développés pour voir si on était capable de prédire, dans le cas des mélanges farine-ergot, les teneurs en ergot de 1 % et, pour les farines adultérées en ergot (Arvalis), les teneurs en ergot de 1,272 % et 2,605 %. On a pu remarquer lors de l'analyse des modèles de classification une certaine confusion pour la prédiction de ces teneurs en ergot.

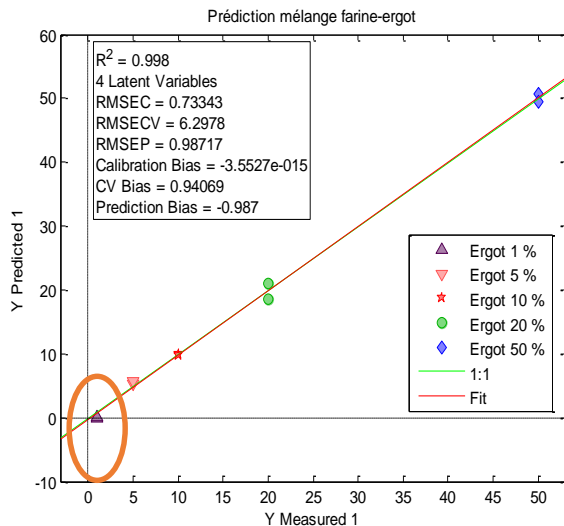


Figure 46 : Prédiction de l'échantillon avec une teneur en ergot de 1 % d'ergot

Un modèle PLS a été construit avec pour set de calibration les spectres moyens de 8 échantillons. Les teneurs en ergot pour ces échantillons sont : 50 %, 20 %, 10 % et 5 %. Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivée (15,2,1) et un autoscale. Pour le set de validation, 2 spectres moyens de l'échantillon d'ergot à 1 % ont été utilisés. Sur l'axe des abscisses sont représentées les valeurs mesurées. L'axe des ordonnées présente les valeurs prédites par le modèle. La Droite 1 : 1 est une droite de pente 1 passant par 0. Elle correspond à une relation parfaite entre les données prédites et mesurées. La droite « fit » est la droite tenant compte du set de calibration et de validation. R^2 = coefficient de détermination des sets de calibration et de prédiction. RMSEC= l'erreur quadratique moyenne de calibration, RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée, RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction, Calibration bias = biais de calibration, CV biais= biais de la validation croisée, Prédiction biais = biais de la prédiction

La **figure 46** présente les résultats de la prédiction de l'échantillon à 1 % (rond orangé).

Ces résultats sont définis par : un coefficient de détermination de 0,99, une RMSEC de 0,73 et une RMSECV de 6,29. L'échantillon à 1 % de teneur en ergot semble bien prédit. En effet, avec un coefficient de détermination proche de 1, la prédiction du modèle est bonne. L'erreur quadratique de prédiction est proche de 1 (0,98).

Avec une RMSEP de 0,98, on a 95 % des échantillons qui sont prédits avec une marge d'erreur égale à deux fois la RMSEP, soit 1,96. Les échantillons avec une teneur en ergot supérieure à 1 % seront bien prédits par le modèle. Mais, avec une teneur en ergot de 1 %, il sera difficile de bien prédire l'échantillon. Effectivement, il est possible qu'à ce pourcentage, compte tenu

des erreurs quadratiques, notamment la valeur élevée de la RMSECV on n'ait pas de l'ergot pur mais plutôt de la farine.

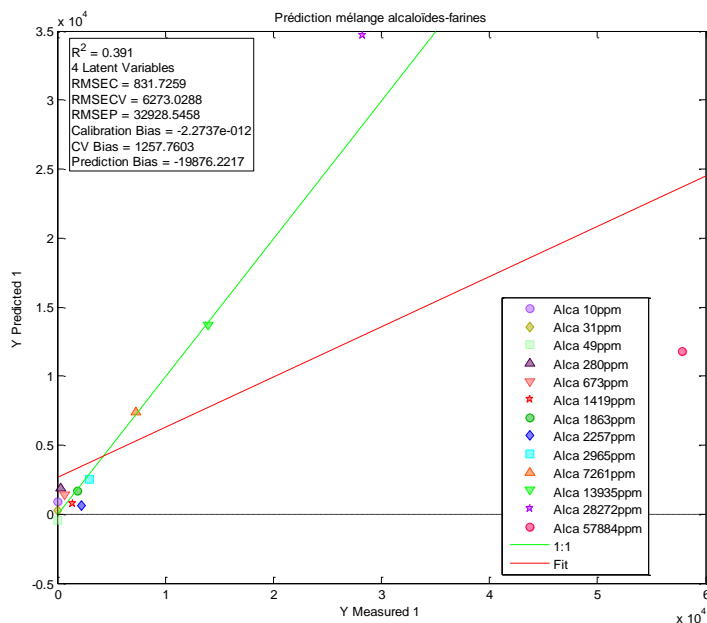


Figure 47 : Prédiction des échantillons avec une teneur en ergot de 1,27 % (28272 ppm) et 2,60 % (57884 ppm)

Un modèle PLS a été construit avec pour set de calibration les spectres moyens de 11 échantillons. Les teneurs en ergot pour ces échantillons varient de 0 % (10 ppm) à 0,627 % (13935 ppm). Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivée (15,2,1) et un autoscale. Pour le set de validation, 2 spectres moyens des échantillons avec une teneur en ergot de 1,27 % (Alca 28272 ppm) et 2,60 % (Alca 57884 ppm) ont été utilisés. Sur l'axe des abscisses sont représentées les valeurs mesurées. L'axe des ordonnées présente des valeurs prédites par le modèle. La Droite 1 : 1 est une droite de pente 1 passant par 0. Elle correspond à une relation parfaite entre les données prédites et mesurées. La droite « fit » est la droite tenant compte du set de calibration et de validation. R² = coefficient de détermination des sets de calibration et de prédiction. RMSEC = l'erreur quadratique moyenne de calibration, RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée, RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction, Calibration biais = biais de calibration, CV biais = biais de la validation croisée, Prédiction biais = biais de la prédiction

La **figure 47** présente les résultats de la prédiction des échantillons avec des teneurs en ergot de 1,27 % (28272 ppm) et 2,60 % (57884 ppm). Ces résultats sont définis par un coefficient de détermination dont la valeur est de 0,39, une RMSEC de 831,7, une RMSECV de 6273, et une RMSEP de 32928,5. Les caractéristiques qui déterminent la qualité du modèle ne sont pas bonnes. En effet, le coefficient de détermination est très faible, et les erreurs quadratiques sont élevées. On a donc une mauvaise prédiction des échantillons avec 1,27 % (28272 ppm) et 2,60 % (57884 ppm) par le modèle. Lorsqu'on compare cette prédiction à celle obtenue avec le modèle de classification, on se rend bien compte du fait qu'avec le modèle PLS-DA « Ergot Vs Farines », on obtient de meilleures prédictions pour les échantillons d'Arvalis.

2.1.5 Analyse exploratoire du son

Lors de l'analyse exploratoire des spectres moyens aux **figures 31 et 37**, on a pu remarquer que le son formait un groupe à part. En effet, il est possible par l'analyse de ces figures de discriminer le son des autres échantillons de farines. Il constitue l'enveloppe du grain de céréales. On distingue plusieurs produits de mouture du grain de céréales (Feillet, 2000) :

- Les farines, qui sont de fines particules d'albumen (30 à 200 μm).
- Les semoules, qui sont de grosses particules d'albumen exemptés d'enveloppes adhérentes (150 à 500 μm).
- Les remoulages, qui sont de fines particules d'enveloppe auxquelles adhèrent des particules d'albumen.
- Les fins sons et les gros sons, qui sont respectivement de petits morceaux d'enveloppe (0,5-1 mm) et de gros morceaux d'enveloppe (1- 5mm) exemptés d'albumen.

Il serait intéressant d'analyser les produits de mouture du grain de céréales, notamment la farine qui est notre objet d'étude, pour déterminer la présence de son. La **figure 48** montre une PCA réalisée avec les spectres des échantillons de son, de farine blanche, de farine semi complète et de farine complète. Une partie du son est discriminée des farines. Mais on retrouve aussi le son groupé avec la farine semi complète et la farine complète. Cela laisse penser que ces farines contiennent du son.

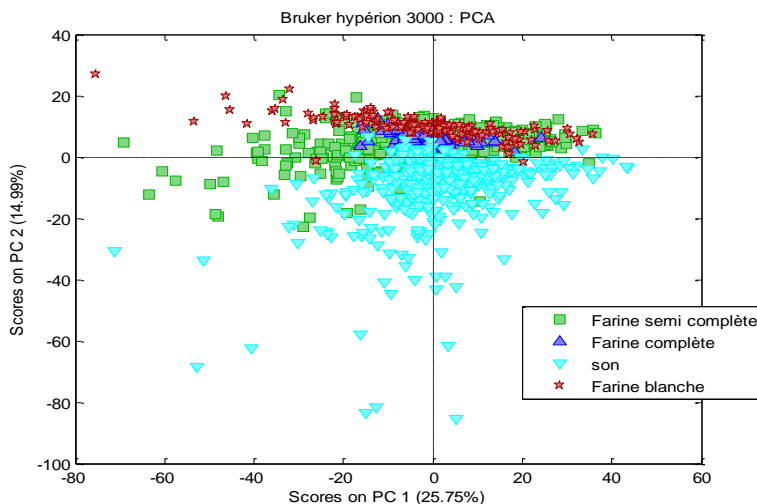


Figure 48 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de son, de farine blanche, de farine semi complète et de farine complète acquis avec le bruker hypérion 3000. Score PC1/PC2. Les spectres sont prétraités avec une snv, une dérivée (15,2,1) et un autoscale. La PC1 explique 25,75 % de variabilité et la PC2 explique 14,99 % de variabilité

2.2 Discussion

Fernández-Ibáñez *et al.*, (2010) ont réalisé une étude sur la création d'une librairie spectrale, à partir d'ingrédients d'origine animale et végétale dans lesquels on retrouve notamment, le blé, l'avoine, le seigle, l'orge et le maïs par microscopie proche infrarouge. Pour ce faire, ils ont utilisé le système auto image du microscope connecté au spectromètre à transformée de Fourier, en mode réflectance. Les spectres obtenus ont été traités par les méthodes chimiométriques et la classification a été réalisée par la méthode des K plus proches voisins. Le résultat de cette étude a mis en exergue :

- L'absence de confusion entre les ingrédients d'origine animale et ceux d'origine végétale. Lorsqu'on considère uniquement le groupe des végétaux, la majorité des céréales a été bien classée. Cependant, plusieurs confusions internes ont été observées entre le blé, l'orge et le maïs. Ils ont obtenu des spectres d'absorption identiques, qui pourraient s'expliquer par la composition de ces céréales, notamment par leur teneur en amidon. Cela met en évidence une limite de cette méthode à discriminer les céréales de compositions proches (Fernández-Ibáñez *et al.*, 2010).

Pour notre étude, nous avons aussi réalisé une librairie spectrale et obtenu des spectres d'absorption identiques pour la grande majorité de nos échantillons excepté pour les échantillons de son. Pour ce faire, nous avons utilisé le NIRM en mode transmittance, nos spectres ont été prétraités par les méthodes chimiométriques et la PLS-DA a été utilisée comme méthode de classification.

3. ANALYSE PAR IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE (NIR-HSI)

3.1 Résultats

3.1.1 Spectres moyens des échantillons

L'annexe 5 présente les spectres moyens des échantillons analysés en NIR-HSI. Plusieurs observations peuvent être faites après l'analyse de ces spectres :

- Les doubles pics lipidiques sont visibles sur le spectre de l'ergot pur.
- Lors de l'analyse en SPIR et en NIRM, on avait un profil spectral du son, proche de celui de l'ergot pur. On n'observe pas cela pour le spectre moyen du son analysé par le NIR-HSI.

- Pour les mélanges farine-ergot de différentes proportions, aucune différence n'a été observée entre les profils de spectres des échantillons avec une teneur en ergot de 50 % et ceux avec une teneur en ergot inférieure à 50 %. Pourtant en NIRM, les doubles pics lipidiques étaient visibles pour le mélange avec une teneur en ergot de 50 % (**figure 36**).

L'analyse des spectres moyens montre que le spectre de l'ergot pur est différent des spectres des autres échantillons. En effet, il est caractérisé par la présence des doubles pics lipidiques que l'on ne retrouve pas sur les spectres moyens des autres échantillons.

3.1.2 Analyse exploratoire

- **PCA sur le set de spectres de particules**

L'**annexe 6** affiche le résultat de l'analyse exploratoire réalisée sur les sets de spectres par particules. On observe une bonne discrimination des spectres de l'ergot pur des autres spectres. Quelques spectres de particules de mélanges farine-ergot avec une teneur élevée en ergot sont présents dans ceux de l'ergot pur. Les spectres de particules de son et de farine de quinoa convergent vers le groupe « ergot pur ». On peut corréliser les résultats de cette analyse exploratoire avec ceux de l'analyse en NIRM (**figures 39 et 40**). Les résultats de l'analyse exploratoire laissent penser qu'il est possible de discriminer l'ergot des farines de céréales. La construction et la validation des modèles permettra soit de renforcer les résultats de cette première analyse, soit de les discréditer.

3.1.3 Modèle de classification

Pour discriminer l'ergot des farines de céréales en NIR-HSI, un modèle PLS-DA « Ergot Vs Farines » à partir des spectres moyens a été construit. Ce modèle s'appuie à la fois sur les observations faites lors de l'analyse exploratoire des spectres moyens et du set de spectres par particules. Pour ce faire, deux classes ont été élaborées : une première classe « ergot pur » composée de 7 échantillons et une deuxième classe « farines » constituée de 11 échantillons de farines de céréales. Quatre variables latentes ont été utiles pour faire ce modèle.

Tableau 12 : Table de confusion validation croisée

	Classe réelle	
	Ergot	Farine
Prédit comme ergot	6	1
Prédit comme farine	1	10

Parmi les 7 échantillons d'ergot utilisés pour réaliser ce modèle, 6 sont prédits comme « ergot » et 1 échantillon est prédit comme étant une farine. Pour les échantillons de farines, nous avons 10 qui sont prédits comme tels et 1 échantillon prédit comme « ergot ». Compte tenu de ces prédictions, le modèle ne semble pas prédire parfaitement les données.

L'annexe 7 présente la prédiction par modèle. Ce dernier est considéré comme étant parfait lorsque les paramètres de sensibilité et de spécificité, pour la calibration et la validation croisée sont égales à 1. Or, ce n'est pas ce qu'on obtient pour ce modèle. En effet, les valeurs de sensibilité (0,86) et de spécificité (0,91) pour la validation croisée sont inférieures à 1. Au vu de cette analyse, le modèle n'est pas « parfait ». Les valeurs obtenues pour les paramètres du modèle peuvent s'expliquer par les incohérences suivantes :

- Dans les mélanges farines-ergot, on retrouve au-dessus de la ligne de discrimination, à la fois, les échantillons ayant une teneur élevée en ergot (points 36,37) et ceux avec de faibles proportions en ergot (points 31,32). De plus, on s'attendrait à voir un gradient de concentration en ergot pour ces échantillons : les plus concentrés au-dessus de ligne de discrimination (Y1) et les moins concentrés en ergot, devraient tendre vers cette ligne.
- Parmi les farines analysées, les échantillons de son devraient être ceux qui convergent le plus vers la ligne de discrimination. Or, ce n'est pas ce qu'on observe (points 38 et 39).
- Enfin, pour les farines adultérées qui proviennent d'Arvalis, les échantillons avec des concentrations en ergot les plus élevées (points 28 et 29) devraient être près de la ligne de discrimination (Y1).

Malgré ces incohérences, le modèle est appliqué sur le set de spectres de particules des mélanges farine-ergot pour la validation (**annexe 8**).

On peut voir que la prédiction des mélanges farine-ergot semble mauvaise. On aurait dû voir un gradient de concentration pour ces échantillons. En effet, les échantillons avec 50 %, 20 %, 10 %, 5 % et 1 % d'ergot devraient être prédits comme « ergot pur » à 50 %, 20 %, 10 %, 5 % et 1 % par le modèle. Toutefois, il faudrait l'information sur le pourcentage de spectres prédits comme « ergot pur » pour conclure sur l'aptitude de ce modèle à prédire ces mélanges. Or, nous n'avons pas eu le temps nécessaire pour le faire. La prédiction pour les farines de céréales et pour les farines adultérées en ergot provenant de chez Arvali n'a pas été concluante. Elle ne sera pas présentée dans ce travail.

L'annexe 9 présente les matrices de confusion du set de calibration, de la validation croisée et de la prédiction. Pour qu'un modèle soit parfaitement capable de prédire les données, les coefficients TP et TN doivent être égaux à 1 pour la calibration, la validation croisée et la prédiction. De plus, les matrices de confusion du set de calibration et de la validation croisée doivent être identiques. Les valeurs de TP et TN sont égales à « 1 » uniquement pour le set de calibration. Le modèle n'est donc pas capable de prédire correctement ces échantillons.

3.1.4 Modèle de calibration

Les modèles de calibration ont été développés pour voir si on peut prédire les plus faibles teneurs en ergot (1 % et 5 %) pour les mélanges farine-ergot.

Sur **l'annexe 10** sont présentés les résultats de la prédiction des échantillons de mélange avec 5 % et 1 % de teneur en ergot. Ces résultats sont définis par un coefficient de détermination de 0,93, une RMSEC de 1,58, une RMSECV de 15,45 et une RMSEP de 9,46.

Le coefficient de détermination a une valeur élevée. On pourrait penser que le modèle prédit correctement nos échantillons. Or, un R^2 élevé ne signifie pas que des prédictions utiles peuvent être faites. En effet, l'intervalle de confiance de prédiction peut être relativement grand, compte tenu de l'objet d'étude de recherche même si R^2 est élevé (Bressoux, 2008). C'est effectivement le cas pour ce modèle. Les erreurs quadratiques ont des valeurs élevées, notamment l'erreur quadratique moyenne de prédiction avec une valeur de 9,46. Les échantillons avec 5 % et 1 % de teneur en ergot ne seront pas bien prédits.

3.2 Discussion

Vermeulen *et al.*, (2012) ont montré dans leur étude qu'il est possible de détecter et de quantifier l'ergot dans les céréales selon les limites fixées par la législation Européenne, par imagerie hyperspectrale. Pour ce faire, sept échantillons de blé avec des concentrations croissantes en ergot ont été préparés et un huitième échantillon a servi de validation. Après la création des bibliothèques, les modèles ont été construits par PLS-DA et SVM avec des échantillons de blé pur, d'ergot pur, appliqués aux échantillons de blé avec des concentrations croissantes en ergot.

Ils sont arrivés à cette conclusion en travaillant avec des sclérotés et des grains entiers, autrement dit avec des échantillons non broyés (Vermeulen *et al.*, 2012). Pour notre étude, nous avons travaillé avec des poudres (échantillons broyés). Malgré les résultats encourageants de l'analyse exploratoire, nous n'avons pas réussi à prouver qu'il est possible de détecter et de quantifier l'ergot dans les farines de céréales par NIR-HSI.

3.3 Comparaison des résultats des méthodes infrarouge

Cette partie a pour but de déterminer la méthode la plus performante pour détecter et quantifier l'ergot des farines de céréales.

L'analyse en SPIR a permis de mettre en évidence plusieurs choses :

- Les doubles pics lipidiques de l'ergot par l'analyse des profils spectraux. On a aussi pu observer que le son avait un profil spectral similaire à l'ergot. De plus, grâce aux longueurs d'onde du visible, on a pu établir un lien entre l'ergot pur et le son de blé. Ces échantillons ont les absorbances les plus élevées entre 400 et 800 nm à cause de leur couleur foncée. Or, dans le visible, plus un échantillon est foncé plus il absorbe.
- L'analyse exploratoire et le modèle construit ont montré qu'il est possible de discriminer l'ergot des échantillons de farines. Toutefois, elle présente une limitation car elle ne permet pas de détecter dans les farines adultérées des spectres prédits comme « ergot ».

L'analyse par NIRM a mis en exergue :

- Les doubles pics lipidiques de l'ergot par l'analyse des spectres. On a aussi observé que le son et le mélange avec 50 % de teneur en ergot avaient un profil similaire à celui de l'ergot pur.

- L'analyse exploratoire a permis de montrer qu'une discrimination de l'ergot des farines de céréales est possible. Les modèles construits démontrent qu'il est possible de discriminer l'ergot des farines de céréales et de prédire les échantillons avec différentes teneurs en ergot. Enfin, une quantification de l'ergot semble possible.
- On obtient avec cette méthode l'information qualitative qui faisait défaut en SPIR. En effet, il est possible par NIRM d'obtenir dans les mélanges farine-ergot et farines adultérées en ergot provenant d'Arvalis, des spectres prédits comme « ergot ». De plus, on peut observer un gradient de concentration lors de l'analyse exploratoire et de la validation du modèle avec le set de spectres par particules pour les mélanges.

L'analyse par NIR-HSI a permis de mettre en évidence :

- Les doubles pics lipidiques de l'ergot par l'analyse spectrale.
- Une discrimination possible de l'ergot par l'analyse exploratoire. Tout comme l'analyse en NIRM, il est possible d'obtenir pour les mélanges farine-ergot et pour les farines adultérées en ergot (Arvalis) des spectres prédits comme « ergot ».

Une prédiction et une quantification des mélanges par le modèle semble mauvaise. Toutefois, ce résultat est à relativiser. En effet, lors de l'analyse en NIR-HSI, un échantillon d'ergot entier a été rajouté aux ergots broyés contrairement à l'analyse en NIRM et en SPIR où seuls les ergots broyés ont été analysés. De plus, il aurait fallu pour la prédiction avec le modèle PLS-DA, avoir l'information sur le pourcentage de spectres effectivement prédits comme « ergot » pour conclure sur la qualité de ce modèle. Les analyses ont été faites en réflexion contrairement aux analyses en NIRM qui ont été réalisées en transmission. Le mode utilisé pour les analyses pourrait être à l'origine des différences de prédictions observées entre le NIRM et le NIR-HSI. Enfin, il faut savoir que tout modèle peut être amélioré, mais nous ne disposons pas suffisamment de temps pour optimiser le modèle NIR-HSI.

La microscopie proche infrarouge, avec sa fenêtre de mesure de 50 μm , semble être la méthode la plus performante pour détecter et quantifier l'ergot des farines de céréales.

4. ANALYSE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE

L'ergot est composé de mycélium riche en lipides. La proportion en lipides du sclérote est de 20 à 40 % de sa masse (Jean, 2009). Pour déterminer si la détection de l'ergot des farines de céréales est possible par microscopie optique, notre étude s'appuie essentiellement sur la

composition chimique de l'ergot, plus précisément sur la teneur en lipides de l'ergot. Pour ce faire, nous avons utilisé le rouge soudan qui colore spécifiquement les lipides en « rouge » par adsorption. Les analyses sont faites par la suite en fond clair et en polarisation. La lumière polarisée permet de discriminer, après coloration, les autres structures des structures lipidiques. En effet, les lipides n'étant pas polarisables, ils ne seront pas observés en polarisation.

4.1 Résultats

4.1.1 Analyse farine blanche - ergot pur

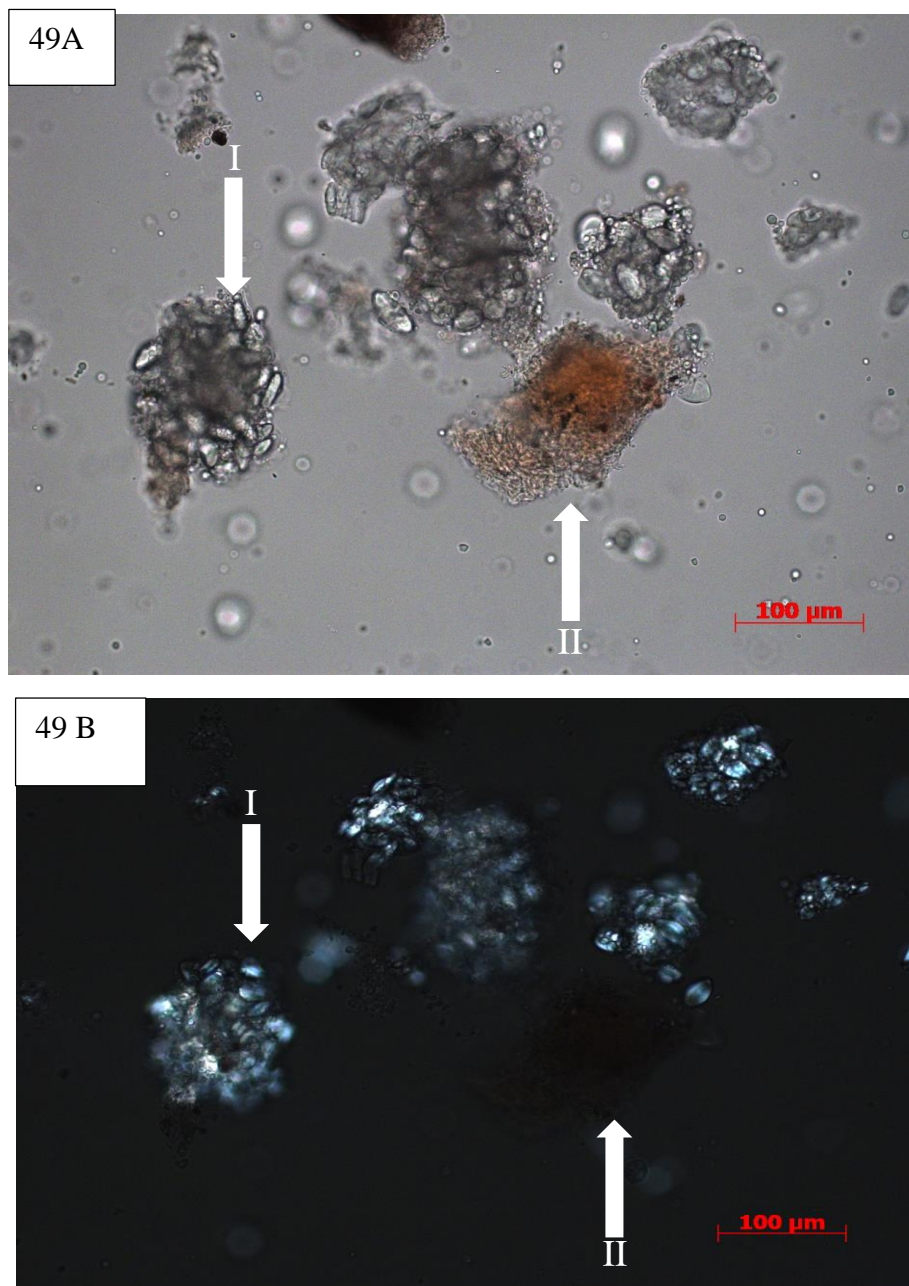


Figure 49 : Mélange farine blanche-ergot pur coloré au soudan rouge. (A) Fond clair, (B) Polarisation. Un fragment de sclérote (I) coloré en fond clair, un agrégat d'amidon (II)

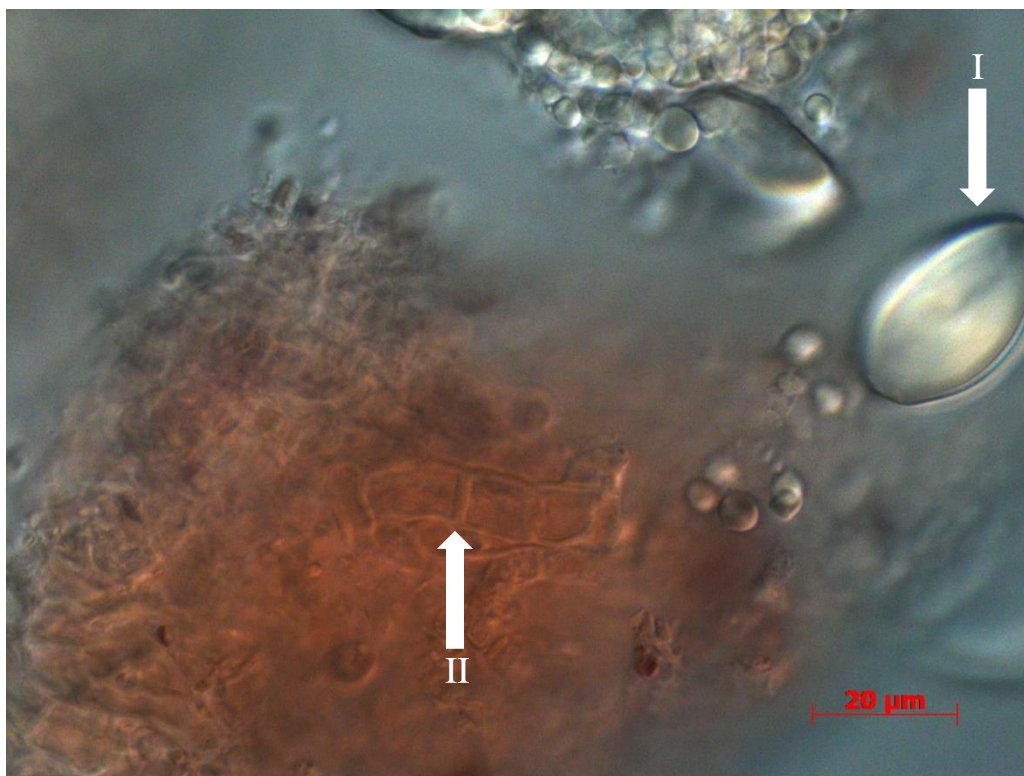


Figure 50 : Grossissement de la structure d'hyphe issue du mélange farine blanche-ergot pur observée en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel) Grain d'amidon (I) Enchevêtrement d'hyphes (II)

La **figure 49** montre le résultat de la coloration du mélange farine blanche-ergot pur.

Il est important de noter que l'on a exactement la même photo dans les deux cas. Cependant, seul le choix de la lumière pour l'analyse change.

Plusieurs observations peuvent être faites :

- En fond clair, on observe une seule particule colorée en rouge. Lorsqu'on bascule en lumière polarisée, cette particule n'est plus visible. Les particules d'amidon n'ont pas été colorées au rouge soudan L'amidon est composé principalement de deux types de molécules¹⁸ : l'amylose (26 à 28 %) et l'amylopectine (72 à 74 %). La composition chimique des grains d'amidon permet d'expliquer cette absence de coloration rouge. Par contre, ceux-ci montrent une biréfringence structurelle très prononcée.

Un grain de céréales est composé du son, d'endosperme et du germe, riche en lipides (Liangli *et al.*, 2012). La farine blanche est dépourvue de germe. Elle est principalement constituée d'amidon. La structure colorée par le rouge soudan (**figure 49 A**) est de l'ergot.

¹⁸ http://www.cra.wallonie.be/img/page/pubtech/LB2006/LB2006_Amidon.pdf

La **figure 50** présente la structure d'hyphes observée en contraste interférentiel différentiel (DIC) qui permet de mettre en évidence les parois. On peut voir un enchevêtrement d'hyphes qui ont été colorés au rouge soudan. On remarque sur cette figure que les parois des hyphes sont épaisses. Un grain d'amidon non coloré est aussi mis en évidence.



Figure 51 : Grossissement de la structure d'hyphe issue du mélange farine blanche-ergot pur observée en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel)

La **figure 51** montre les hyphes septés. Ces dernières sont un enchevêtrement d'hyphes connectés à d'autres structures. On observe des pores (flèche blanche) qui permettent la communication du cytoplasme. Par ailleurs, on peut apercevoir de nouveau les parois épaisses de l'hyphes.

4.1.2 Analyse de la farine complète

Après l'étude sur la farine blanche, on s'est intéressé à la farine complète. Cette dernière est non seulement composée d'amidon, mais aussi de germe et de son. Le but de cette analyse est de voir si on arrive à discriminer l'ergot d'une farine complète grâce à la coloration au soudan rouge.

Pour ce faire, une observation détaillée des constituants de farine complète après coloration au soudan rouge est nécessaire. On a pu remarquer par l'analyse d'une farine complète non colorée au soudan rouge et celle colorée qu'il y'a une différence de couleur entre les deux farines complètes. Autrement dit, on a un constituant de la farine complète riche en lipides qui est coloré en rouge par adsorption grâce au colorant.

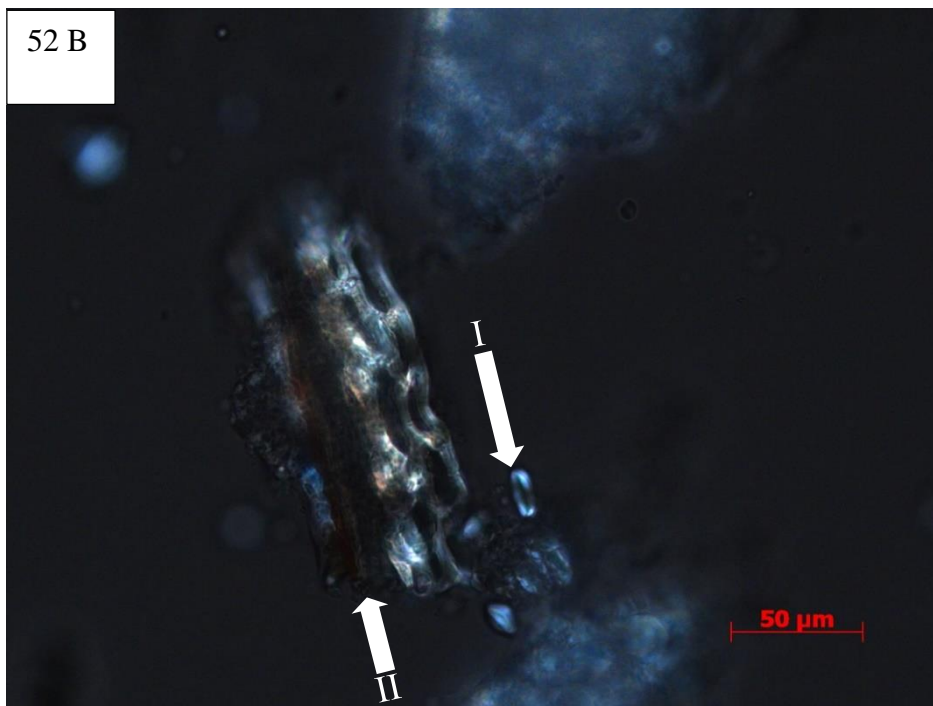


Figure 52 : Farine complète colorée au rouge soudan (A) Fond clair, (B) Polarisation. Un grain d'amidon isolé (I), un fragment de son couleur ocre-rouge en fond clair (II)

La **figure 52** présente un fragment de son (péricarpe) identifié dans l'échantillon de farine complète coloré au soudan rouge. Les fragments de son, c'est -à -dire des agglomérats de téguments, sont naturellement de couleur ocre-roux (Ferrando *et al.*, 1966). La coloration au soudan rouge n'a pas eu d'effet sur ce constituant de la farine complète. De plus, il est complètement polarisé au même titre que le grain d'amidon (I). Les parois de ce fragment sont beaucoup plus organisées contrairement à celles de l'hyphe.

L'étape suivante aurait été d'observer un fragment du germe, et de voir si la coloration au rouge soudan a eu un effet sur ce constituant de la farine complète. Dans un grain de blé, le germe est riche en protéines et contient également l'essentiel des lipides du grain (Feillet, 2000). Nous n'avons pas pu observer le germe dans la farine complète ni extraire ce dernier d'un grain de blé en vue d'une analyse comparative avec une structure d'hyphe.

7.4 Discussion

Les analyses réalisées pour répondre à notre problématique ont permis de mettre en exergue plusieurs points :

Dans un mélange farine blanche-ergot pur, la coloration au rouge soudan suivie de l'analyse en fond clair et lumière polarisée permettent la détection de l'ergot. En effet, pour ce mélange, le soudan rouge colore par adsorption les lipides contenus dans le sclérote de l'ergot. Pour toutes les autres farines de céréales, notamment toutes celles susceptibles de contenir du germe, il faut une étude de la structure cellulaire. Les végétaux et les champignons n'ont pas la même structure. En effet, les tissus végétaux sont constitués de cellules différenciées dont les parois sont facilement identifiables en microscopie. Les tissus fongiques, eux, sont constitués d'entrelacements d'hyphes non pectocellulosiques qui sont peu différenciés.

Le germe est un ensemble de cellules qui est en voie de différenciation. Autrement dit, on a une gemmule, une radicule qui forment une plantule et tout est à l'état embryonnaire. A ce stade, les parois possèdent peu, voire pas de caractère biréfringent car on n'a pas encore la formation d'une paroi primaire complètement différenciée. On n'a pas une organisation de microfibrille, cellulose et hémicellulose, ce qui veut dire que la polarisation n'est pas encore effective. D'où la confusion possible avec les cellules d'hyphes. Toutefois, les cellules d'hyphes sont complètement différentes des cellules végétales. En effet, elles ont une structure très régulière et une paroi très épaisse (**figures 50 et 51**). L'enchevêtrement d'hyphes est tout à fait caractéristique et ne ressemble à rien d'autre.

Pour conclure, on distingue 3 cas de figure :

- Dans un mélange farine blanche-ergot, si on observe une structure lipidique colorée en rouge par adsorption du soudan rouge et qui ne polarise pas, on peut conclure que ce sont les lipides contenus dans le sclérote de l'ergot.
- Dans un mélange d'une farine quelconque-ergot, si on a une structure lipidique rouge mais qui polarise, on peut dire que c'est une cellule végétale car l'hyphe ne polarise pas.
- Dans un mélange farine (contient du germe) – ergot, si on obtient un fragment lipidique rouge qui ne polarise pas, l'analyse de la structure cellulaire du fragment permettra de déterminer si c'est un fragment lipidique de l'ergot.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce mémoire était le développement de méthodes en spectroscopie et microscopie proche infrarouge pour la détection et la quantification de l'ergot dans les farines de céréales.

Pour ce faire, plusieurs étapes ont été nécessaires :

- La première étape a été de créer des bibliothèques spectrales qui ont permis de construire les modèles. Les bibliothèques ont donc été créées pour les analyses en SPIR, en NIRM et en NIR-HSI.
- La deuxième étape consistait en une analyse des spectres moyens des bibliothèques. On a pu, grâce à cela, mettre en évidence les doubles pics lipidiques des spectres de l'ergot quelle que soit la méthode. De plus, cela a permis de montrer que les échantillons de son ont un profil spectral proche de celui de l'ergot.
- La troisième étape était une analyse exploratoire. Elle a permis de discriminer l'ergot des autres échantillons en SPIR, NIRM et NIR-HSI. On a pu observer, pour les échantillons de mélanges, des gradients de concentration. Les échantillons avec des teneurs élevées en ergot se retrouvaient plus proches du groupe formé par l'ergot pur, c'est le cas pour les échantillons avec 50 % et 20 % de teneur en ergot. Les échantillons avec une teneur plus faible (10 %, 5 % et 1 %) sont soit regroupés avec les farines, soit entre échantillons de mélanges de faible teneur en ergot. Enfin, les farines les plus riches en matière grasse à savoir, le son de blé, le son d'avoine et la farine de quinoa ont tendance à être plus proches du groupe de l'ergot pur. Par ailleurs, cette analyse a permis de mettre en exergue une limite du SPIR par rapport aux NIRM et NIR-HSI : pour les échantillons de mélanges farine-ergot, on a pu observer certains spectres de ces mélanges, typiques de l'ergot pur dans le groupe formé par « ergot pur » d'autres spectres caractéristiques des farines pures groupés avec les farines de céréales pour l'analyse en NIRM et NIR-HSI. Or, pour l'analyse en SPIR, il n'a pas été possible d'obtenir cette information pour les spectres de farines adultérées (Arvalis). Cela montre une limitation de la SPIR par rapport à la qualité de l'information spectrale.
- La quatrième étape était la construction du modèle PLS-DA, sur base des observations de l'analyse exploratoire. Le modèle « ergot pur contre farine pure » a été construit en SPIR, NIRM et NIR-HSI. Les performances des modèles en SPIR et NIRM réalisés sur les spectres moyens sont meilleures que celles du modèle en NIR-HSI.

Le modèle a ensuite été appliqué aux sets de spectres de particules des mélanges farine-ergot et des farines adultérées en ergot (Arvalis) pour quantifier le nombre de spectres détectés comme « ergot » et comme « farine ». En NIR-HSI, tous les échantillons semblent mal prédits. Toutefois, il aurait fallu déterminer le pourcentage de spectres prédits comme ergot pur. Cela aurait permis de voir si effectivement les prédictions du modèle sont mauvaises. En NIRM, les échantillons de mélanges farine-ergot semblent bien prédits avec un coefficient de détermination de 0,98. On obtient des pourcentages de spectres prédits comme « ergot pur » du même ordre de grandeur. Pour les échantillons à 50 %, 20 %, 10 %, 5 % et 1 % de teneur en ergot, on obtient respectivement les prédictions suivantes : 44,06 %, 10,07 %, 10,45 %, 0,69 %, 1,07 %. Pour les farines adultérées en ergot (Arvalis), 12 échantillons sur 13 sont bien prédits. Tous les échantillons avec une teneur en ergot inférieure à 1 % ont 0 % de spectres prédits comme « ergot pur » excepté l'échantillon (alca 1863 ppm) dont la teneur réelle en ergot est de 0,08 %. Or, il est prédit à 1,08 %. Les échantillons avec une teneur réelle de 1,27 % et 2,60 % sont prédits respectivement à 5,95 et 2,23 %. Il est à noter que pour ces deux échantillons, on dénombre pour chacun 8 spectres prédits comme « ergot ». Mais la grande disparité en termes de nombre total de spectres induit un pourcentage beaucoup plus élevé pour la teneur réelle en ergot la plus faible. On devrait s'en tenir pour ces deux échantillons uniquement aux spectres prédits comme « ergot ». Après une analyse en NIRM, on obtient 400 spectres dans lesquels il faut enlever ceux correspondant au background. Le nombre de spectres après nettoyage varie d'un échantillon à l'autre. C'est effectivement le cas pour ces deux échantillons : on a un nombre identique de spectres prédits comme « ergot » mais, étant donné que l'échantillon avec une teneur de 1,27 % d'ergot a moins de spectres après nettoyage, il se retrouve donc avec le pourcentage de spectres prédits comme « ergot pur » le plus important.

- La dernière étape était la quantification des mélanges. Pour ce faire, un modèle PLS réalisé sur les spectres moyens a été construit. Pour les mélanges farine-ergot, les échantillons avec des teneurs en ergot de 50 %, 20 %, 10 % et 5 % ont été utilisés pour la calibration.

L'échantillon avec une teneur en ergot de 1 % a été utilisé pour la validation du modèle. En NIRM, une quantification de l'ergot semble possible. La quantification pour les farines adultérées en ergot (Arvalis) n'a pas été concluante.

En NIR-HSI, la quantification sur les mélanges farine-ergot et Arvalis a donné de mauvais résultats.

On a réussi à démontrer grâce à ce travail que la microscopie proche infrarouge est la méthode la plus performante pour détecter et quantifier l'ergot des farines de céréales avec une limite de détection de 1 %.

Dans une autre approche, la détection de l'ergot dans les farines de céréales a été mise en évidence par la microscopie optique. En effet, l'analyse par microscopie optique couplée à la coloration au rouge soudan offre des possibilités pour la détection de l'ergot dans les farines de céréales.

En guise de perspectives, plusieurs choses pourraient être faites dans la continuité de ce travail :

- Voir s'il est possible de descendre plus bas que 1 % en termes de limite de détection.
- Faire une étude uniquement avec des farines de céréales riches en matière grasse. Le but serait de voir si on arrive à discriminer l'ergot des farines riches en matière grasse par l'analyse NIRM. On a pu constater au travers de l'analyse exploratoire sur le set d'échantillon et la validation du modèle à partir des farines de céréales, que les farines avec une teneur élevée en lipides avaient tendance à être classées comme « ergot ».
- Déterminer le pourcentage de spectres prédits comme « ergot » pour le NIR-HSI en tenant compte dans le modèle uniquement des échantillons d'ergot broyés. Autrement dit, réaliser le modèle sur base des spectres moyens des farines pures et d'ergot pur sans inclure l'échantillon d'ergot entier. Le but serait de comparer par la suite les prédictions obtenues à celles de l'analyse en NIRM.
- Optimiser le modèle NIR-HSI pour qu'il soit plus adapté à notre objet d'étude.
- Réaliser une étude sur la détection du son dans les farines de céréales afin de détecter les fraudes potentielles dans les farines complètes et semi-complète.
- Disséquer le germe de blé puis faire par la suite une coloration au rouge soudan et une analyse en fond clair et lumière polarisée.

Cela permettrait de faire une étude comparative entre la structure du germe et celle de l'hyphe. Cette étude servirait de référence en cas de détection de l'ergot dans les farines contenant du germe.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ballabio, D., Consonni, V. 2013. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* 5, 3790–3798.
- Bao, J. 2012. Nutraceutical properties and health benefits of rice. *In* : Cereal and pulses : Nutraceutical properties and health benefits, first edition. Edited by Liangli (lucy)Yu,Rong Tsao and Fereidoon shahidi) P37-64
- Belser-Ehrlich, S., Harper, A., Hussey, J., Hallock, R., 2013. Human and cattle ergotism since 1900 Symptoms, outbreaks, and regulations. *Toxicol. Ind. Health* 29, 307–316.
- Bertrand, D. 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *Prod. Anim.* 15, 209–219.
- Bertrand, D., Courcoux, P., Qannari, E. M. 2000. Méthodes exploratoires. *In* : La spectroscopie infrarouge et ses applications, première édition , Tec & Doc :P 267-293
- Bertrand, D. 2000. Instrumentation. *In* : La spectroscopie infrarouge et ses applications, première édition Tec & Doc. p213-257.
- Bertrand, D., Qannari, E. M. 2000. Introduction à la chimiométrie. *In* : La spectroscopie infrarouge et ses applications, première édition.Tec & Doc :P 261-264
- Bertrand, D ; Dufour E. 2000. La spectroscopie infrarouge et ses applications. Tec & doc
- Bertrand,D., Dufour,E.,2006. La spectrsocopie infrarouge.Lavoisier
- Beuerle, T., Benford, D., Brimer, L., Cottrill, B., Doerge, D., Dusemund, B., Farmer, P., Fürst, P., Humpf, H., Mulder, P.P.J. 2012. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA J.* 10, 158.
- Boubellouta, T. 2008. Apports des spectroscopies infrarouge et de fluorescence couplées à la chimiométrie pour la caractérisation de la structure de matrices fromagères et des relations structure-texture. Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de docteur en science des aliments. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Burfening, P.J. 1994. Ergotism in domestic livestock, *in*: Montana Nutrition Conference Special Report SR-50. Pp. pp. 8–1.
- Carlson, M.P. 2011. Ergot of Small Grain Cereals and Grasses and its Health Effects on Humans and Livestock.
- Chen, F., Luo, Yan., Cheng, F. 2012. Unsound kernel identification using linear colour charge-coupled divice. Article de revue.

- Collin, S. 2014. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Support de cours, 2013-2014. Université Catholique de Louvain-La-Neuve. Cours d'analyse organique 1.
- Corniere, A. 2014. Les alcaloïdes de l'ergot : mycotoxines ré-émergentes? Toxinogénèse et toxicité pour l'homme et les animaux. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire de l'université de Toulouse.
- Coufal-Majewski, S., Stanford, K., McAllister, T., Blakley, B., McKinnon, J., Chaves, A.V., Wang, Y. 2016. Impacts of cereal ergot in food animal production. *Front. Vet. Sci.* 3.
- Cozzolino, D. 2014. An overview of the use of infrared spectroscopy and chemometrics in authenticity and traceability of cereals. *Food Res. Int., Authenticity, Typicality, Traceability and Intrinsic Quality of Food Products* 60, 262–265.
- Dale, L.M., Thewis, A., Boudry, C., Rotar, I., Dardenne, P., Baeten, V., Fernandez Pierna, J.A. 2013. Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: a review. *Appl. Spectrosc. Rev.* 48, 142–159.
- De Groot, I. 2004. Protection des céréales et des légumineuses stockées, 2004. .Agromisa Foundation. En ligne : <http://agro-planet.e-monsite.com/medias/files/la-protection-des-cereales-et-des-legumineuses-stockees.pdf>
- Diem, M. 1993. Introduction to modern vibrational spectroscopy. Wiley New York.
- European Commission. 2002. Directive of The European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed 2002/32. EC.
- Government of Saskatchewan, 2000. Ergot of Cereals and Grasses. En ligne: <https://www.saskatchewan.ca/business/agriculture-natural-resources-and-industry/agribusiness-farmers-and-ranchers/crops-and-irrigation/crop-protection/disease/ergot-of-cereals-and-grasses> (Consulté le 23 mai 2016).
- Fernandez Pierna, J. A. 2016. Introduction to chemometrics. Training session on vibrational spectroscopy and chemometrics. Wallon Research Center. Gembloux, Belgium.
- Fernández Pierna, J.A., Vermeulen, P., Amand, O., Tossens, A., Dardenne, P., Baeten, V. 2012. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. *Chemom. Intell. Lab. Syst., Special Issue Section: Selected Papers from the 1st African-European Conference on Chemometrics, Rabat, Morocco, September 2010 Special Issue Section: Preprocessing methods Special Issue Section: Spectroscopic imaging* 117, 233–239.
- Fernández-Ibáñez, V., Fearn, T., Soldado, A., de la Roza-Delgado, B. 2010. Development and validation of near infrared microscopy spectral libraries of ingredients in animal feed as a first step to adopting traceability and authenticity as guarantors of food safety. *Food Chem.* 121, 871–877.
- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., Puel, O., 2006. Toxicologie des mycotoxines: dangers et risques en alimentation humaine et animale. Mémoires. Bull. Acad. Vet. France.

- Gan, S.D., Patel, K.R. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–3.
- Gowen, A.A., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., Downey, G., Frias, J.M. 2007. Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 590–598.
- Goetz, A. 1985. Imaging spectrometry for earth remote sensing. *Science*, 228:1147–1153.
- Govaerts, B. 2016. Chimométrie. Support de cours BIRC 2015-2016, Université Catholique de Louvain-La-Neuve.
- Gromski, P.S., Muhamadali, H., Ellis, D.I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M.L., Goodacre, R. 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* 879, 10–23.
- Herent, M. F. 2015. Spectrométrie Infra-Rouge. Support de cours BIRC 2014-2015, Université Catholique de Louvain-La-Neuve. Cours d'analyse organique II.
- Humecki, H.J. 1995. Practical guide to infrared microspectroscopy. CRC Press.
- Jean, B. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.). Lavoisier.
- Jing, P; Hu, X. 2012 .Nutraceuti properties and health benefits of oats. *In Cereal and pulse : Nutraceutical properties and health benefits*, first edition. Edited by Liangli (lucy)Yu,Rong Tsao and Fereidoon shahidi) P21-36
- Kang, K.A., Lee, J.H., Zhang, R., Piao, M.J., Chung, H.S., Hyun, J.W. 2010. Oryzadine, a new alkaloid of *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo, attenuates oxidative stress-induced cell damage via a radical scavenging effect. *Food Chem.* 119, 1135–1142.
- Koziol, M. 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Compos. Anal.* 5, 35–68.
- Krkošková, B., Mrazova, Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Res. Int.* 38, 561–568.
- Krska, R., Crews, C. 2008. Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: a review. *Food Addit. Contam.* 25, 722–731.
- Lachenal, G. 2000. Introduction à a spectroscopie infrarouge. *In : Dans La spectroscopie infrarouge et ses applications*, première édition. Tec & doc P31-74
- Li, S., Zhang, Q.H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41, 451–464.
- Liangli, L.Y., Tsao, R., Shahidi, F. 2012. Cereals and pulses: nutraceutical properties and health benefits. John Wiley & Sons.

- Li, S., Zhang, Q. H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical Reviews in food science and nutrition*, 41: 451-464
- Lobo, A.M., Prabhakar, S., Benito-Rodriguez, A.M. 1981. The alkaloids of Portuguese ergot. *Rev Port Quim* 23, 1–6.
- Luthria, D., Ghatak, R., Huang, H. 2012. Plenolic phytochemicals from rye (*secale cereale* L). *In Cereal and pulses: Nutraceutical properties and health benefits*, first edition. (Edited by Liangli(lucy)Yu,Rong Tsao and Fereidoon shahidi) p71-84.
- Luo, Y., Wang, L. 2012. Bioactive compound in corn. *In Cereal and pulses: Nutraceutical properties and health benefits*, first edition. (Edited by Liangli(lucy)Yu,Rong Tsao and Fereidoon shahidi) p85-103
- Manske, R.H.F., Holmes, H.L. 2014. *The alkaloids: chemistry and physiology*. Elsevier.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G., Buydens, L.M.C., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. 1997. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Elsevier Science Inc.
- Meurens, M. 2000. Acquisition et traitement du signal spectrophotométrie. *In : spectroscopie infrarouge et ses applications*, première édition. Edité par Bertrand, D ; Dufour, E P199-211.
- Miralbés, C. 2008. Discrimination of European wheat varieties using near infrared reflectance spectroscopy. *Food Chem.* 106, 386–389.
- Mitchell, D.T., Cooke, R.C. 1968. Some effects of temperature on germination and longevity of sclerotia in *Claviceps purpurea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51, 721–729.
- Morsomme, P. 2014. *Microscopie et fluorescence. Support de cours, 2014-2015*. Université Catholique de Louvain-La-Neuve.Cours d'analyse biochimique.
- Murray, T.D., Parry, D.W., Cattlin, N.D. 2008. *Diseases of small grain cereal crops: a colour handbook*. CRC Press.
- Osborne,B.G., Fearn.T.1986.Near infrared spectroscopy in food analysis. Longman, Scientific and technical, harlow, essec, UK.
- Pins, J.J and Kaur, H. 2006. A reviews of the effects of barley β -glucan on cardio vascular and diabetic risk. *Cereal foods world*, 51 : 296-314
- Piraux, F., Dardenne, P. 2000. Microscopie-NIR appliquée aux aliments du bétail. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 4, 226–232.
- Ravikanth, L., Singh, C.B., Jayas, D.S., White, N.D.G. 2015. Classification of contaminants from wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Biosyst. Eng.* 135, 73–86.

- Ruales, J. 1992. Development of an infant food from quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd): technological aspects and nutritional consequences. PhD thesis, University of Lund Sweden.
- Schnitzius, J.M., Hill, N.S., Thompson, C.S., Craig, A.M. 2001. Semiquantitative determination of ergot alkaloids in seed, straw, and digesta samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 230–237.
- Schumann, B., Lebzien, P., Ueberschär, K.-H., Spilke, J., Höltershinken, M., Dänicke, S. 2008. Effects of the level of feed intake and ergot contaminated concentrate on ruminal fermentation and on physiological parameters in cows. *Mycotoxin Res.* 24, 57–72.
- Schumann, G.L. 2000. Ergot. The Plant Health Instructor. University of Massachusetts
- Solomon, J., Rock, B. 1985. Imaging spectrometry for earth remote sensing. *Science* 228, 1147–1152.
- Van Dongen, P.W.J., de Groot, A.N.J.A. 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 60, 109–116.
- Vermeulen, P., Pierna, J.F., Egmond, H. van, Dardenne, P., Baeten, V. 2012. Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using near infrared hyperspectral imaging. *Food Addit. Contam. Part A* 29, 232–240.
- Vermeulen, P., Pierna, J.F., Sinnaeve, G., Dardenne, P., Baeten, V. 2009. Detection of ergot bodies in cereals by NIRS and hyperspectral NIR imaging, *in*: Presented at the 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy in Bangkok on. p. 12.
- Vigneau, N. 2010. Potentiel de l'imagerie hyperspectrale de proximité comme outil de phénotypage: application à la concentration en azote du blé. Montpellier, SupAgro.
- Vigneau, E., Qannari, E. M., Devaux, M. F. 2000. Méthodes prédictives. In : *La spectroscopie infrarouge et ses applications*, première édition. Tec & Doc: P295-329
- Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M., Windig, W., Koch, R.S. (2006). PLS Toolbox 4.0 for use with MATLAB™. Wenatchee: Eigenvector Research.
- Zeilmaker, G.H., Carlsen, R.A. 1962. Experimental studies on the effect of ergocornine methanesulphonate on the luteotrophic function of the rat pituitary gland. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 41, 321–335.














VII. ANNEXES

Annexe 1 : Echantillon adultérées en ergot (Arvalis)

Liste des correspondances n°interne / réf.client

DQ150895

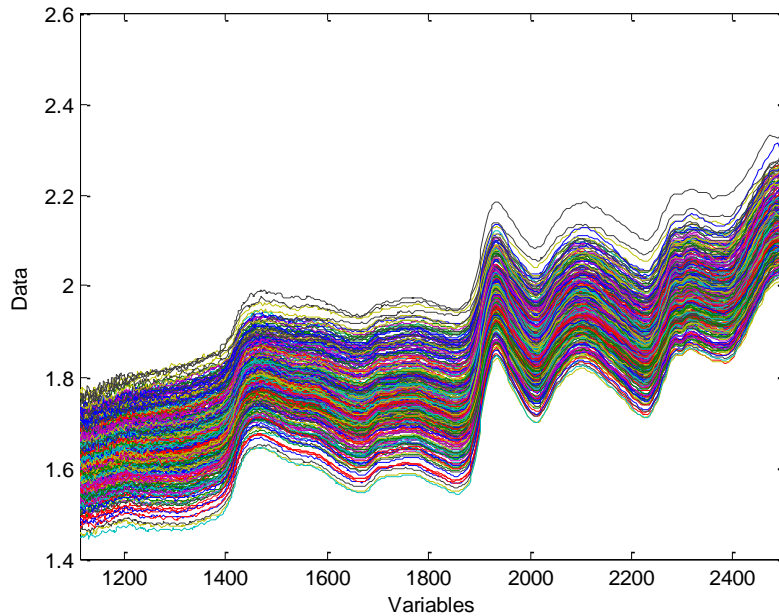
N°CE 15/056 ARVALIS

Numéro interne	Référence client	Commentaires	Codebarre
DQ150895-001	RT01	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-002	RT02	SEIGLE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-003	RT03	SEIGLE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-004	RT04	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-005	RT05	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-006	RT06	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-007	RT07	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-008	RT08	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-009	RT09	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-010	RT10	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-011	RT11	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-012	RT12	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	
DQ150895-013	RT13	BLE TENDRE Contaminé à l'ergot	

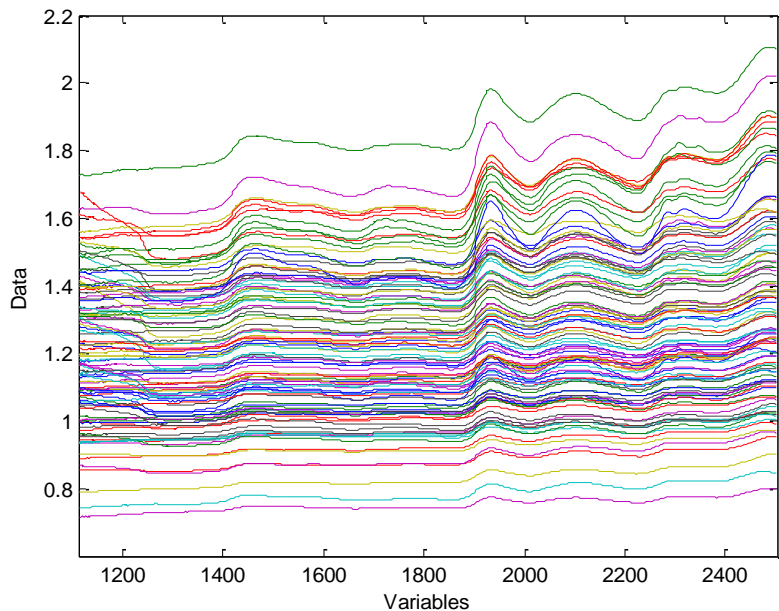
	0,22% d'alcaloïde dans l'ergot		
	0,45g d'ergot / kg d'échantillon	0,001g d'alcaloïdes / kg d'échantillon	% ergot
1000	0,45	0,001	0,045%
10	0,00450	0,00001	0,000%
49	0,02205	0,000049	0,002%
1863	0,83835	0,001863	0,084%
31	0,01395	0,000031	0,001%
280	0,12600	0,00028	0,013%
673	0,30285	0,000673	0,030%
1419	0,63855	0,001419	0,064%
2257	1,01585	0,002257	0,102%
2965	1,33425	0,002965	0,133%
7261	3,26745	0,007261	0,327%
13935	6,27075	0,013935	0,627%
28272	12,72240	0,028272	1,272%
57884	26,04780	0,057884	2,805%

Annexe 2 : Choix du mode d'analyse en NIRM

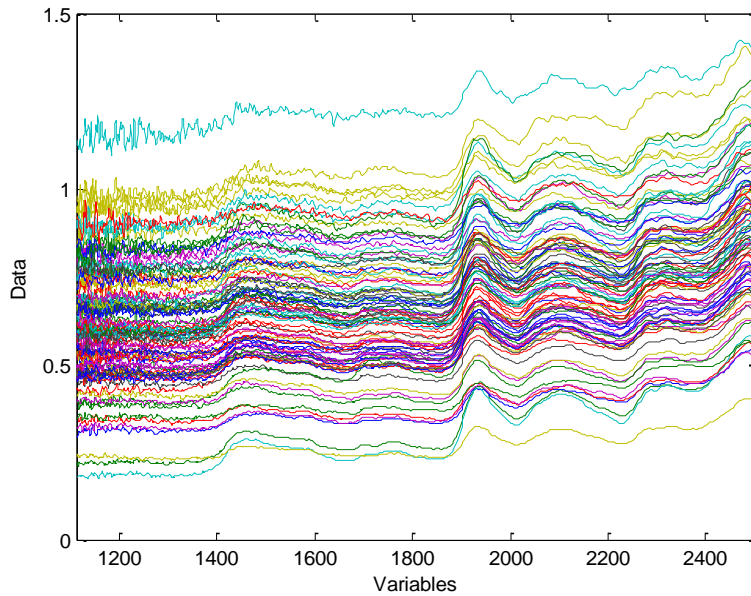
La comparaison des deux modes d'analyse a pour but le choix du mode avec la plus petite fenêtre d'analyse (meilleure résolution spatiale), qui permet l'obtention d'un grand nombre de spectres exploitables en vue du traitement de données.



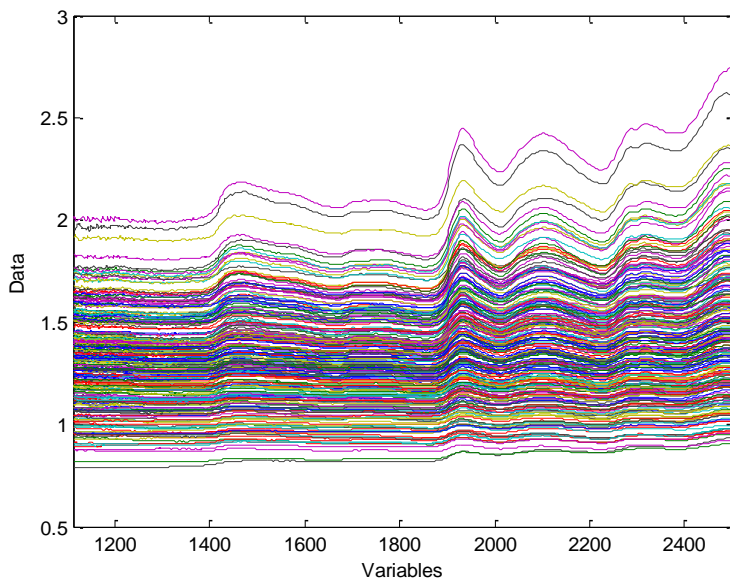
- Analyse en mode réflexion avec une fenêtre de **160 μm** (**371 spectres** exploitables obtenus)



- Analyse en mode transmission avec une fenêtre de **160 μm** (**104 spectres** exploitables obtenus)



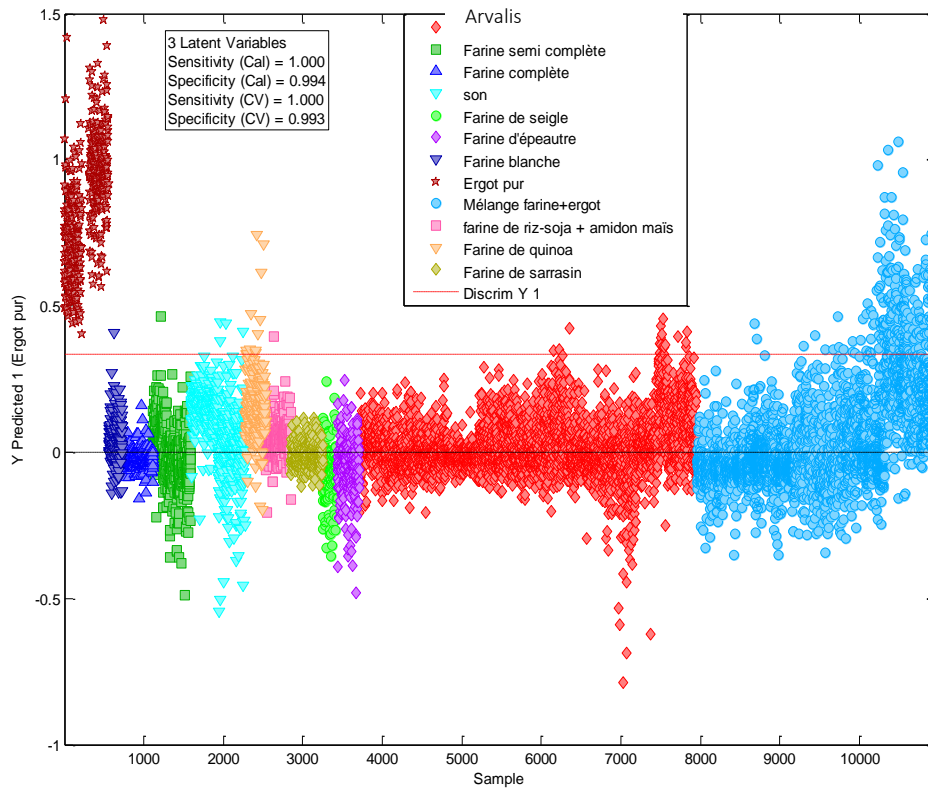
- Analyse en mode réflexion avec une fenêtre de **50 μm** (**96 spectres** exploitables obtenus)



- Analyse en mode transmission avec une fenêtre de **50 μm** (**236 spectres** exploitables obtenus)

Les différents modes d'analyse et les fenêtres de mesure utilisées. Lorsqu'on compare le nombre de spectres exploitables entre ces modes, on se rend bien compte que seul l'analyse en transmission avec une fenêtre de mesure de 50 μm permet d'obtenir un plus grand nombre de spectres utilisables en vue du traitement de données.

Annexe 3 : Modèle « Ergot Vs Farines » réalisé à partir des spectres de particules acquis avec le Bruker Hypérior 3000.



Pour réaliser ce modèle, les spectres ont été prétraités avec une SNV et une dérivée (15,2,1).
La validation croisée appliquée est « Leave-one-out »

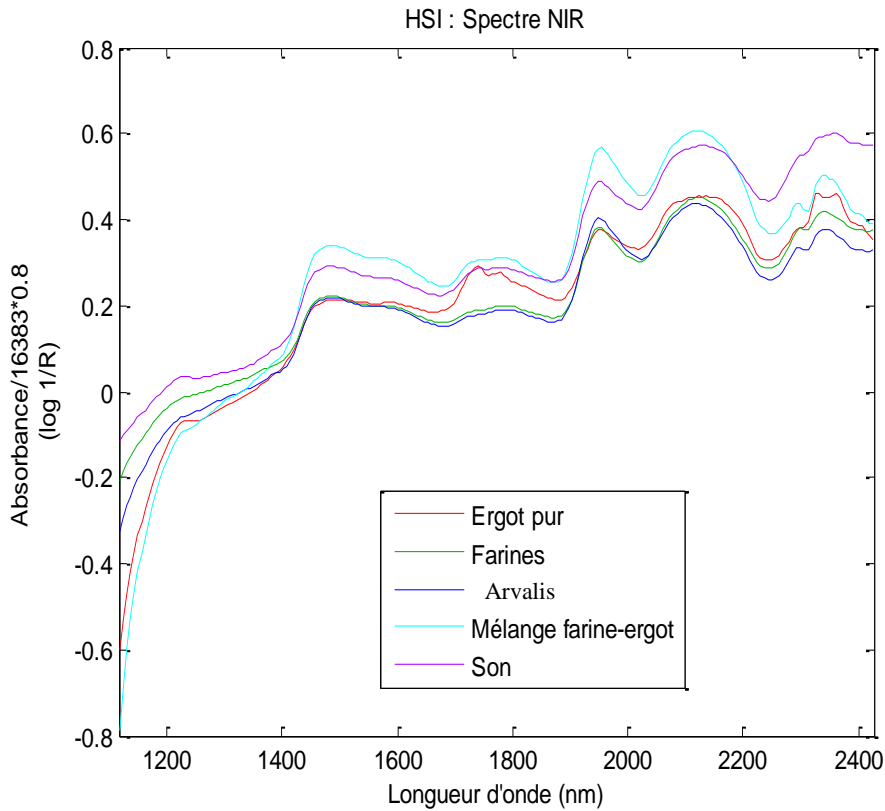
Annexe 4 : Valeurs de prédiction des farines de céréales et des mélanges de farine avec de l'ergot

	Pred T. Ergot (%)	Pred T. farine (%)	Valeur de référence pour le teneur en farine (%)	Valeur de référence pour la teneur en ergot	Nombre de spectres prédits comme ergot	Nombre total de spectres
F. blanche	0	100	100	0	0	171
F. complète	0	100	100	0	0	384
F. s. complète	0,21	99,79	100	0	1	479
F. de seigle	1,08	98,92	100	0	2	185
F. de quinoa	9,64	90,36	100	0	24	249
F. de sarrasin	0	100	100	0	0	400
F. de riz-soja	0,94	99,06	100	0	3	319
Son	17,64	82,36	100	0	121	686
F. épeautre	0	100	100	0	0	275
Ergot 1 %	1,07	98,93	99	1	7	653
Ergot 5 %	0,69	99,31	95	5	4	583
Ergot 10 %	10,45	89,55	90	10	58	555
Ergot 20 %	10,07	89,93	80	20	57	566
Ergot 50 %	44,06	55,94	50	50	282	640
A 10 ppm	0	100	100	0	0	327
A 31 ppm	0	100	100	0	0	399
A 49 ppm	0	100	100	0	0	382

A 280 ppm	0	100	99,99	0,01	0	400
A 673 ppm	0	100	99,97	0,03	0	384
A1419 ppm	0	100	99,94	0,06	0	394
A 1863 ppm	1,08	98,92	99,92	0,08	4	370
A 2257 ppm	0	100	99,90	0,10	0	394
A 2965 ppm	0	100	99,87	0,13	0	214
A 7261 ppm	0,90	99,10	99,67	0,33	2	222
A 13935 ppm	0	100	99,37	0,63	0	270
A 28272 ppm	5,93	94,07	98,73	1,27	8	135
A 57884 ppm	2,23	97,77	97,40	2,61	8	358

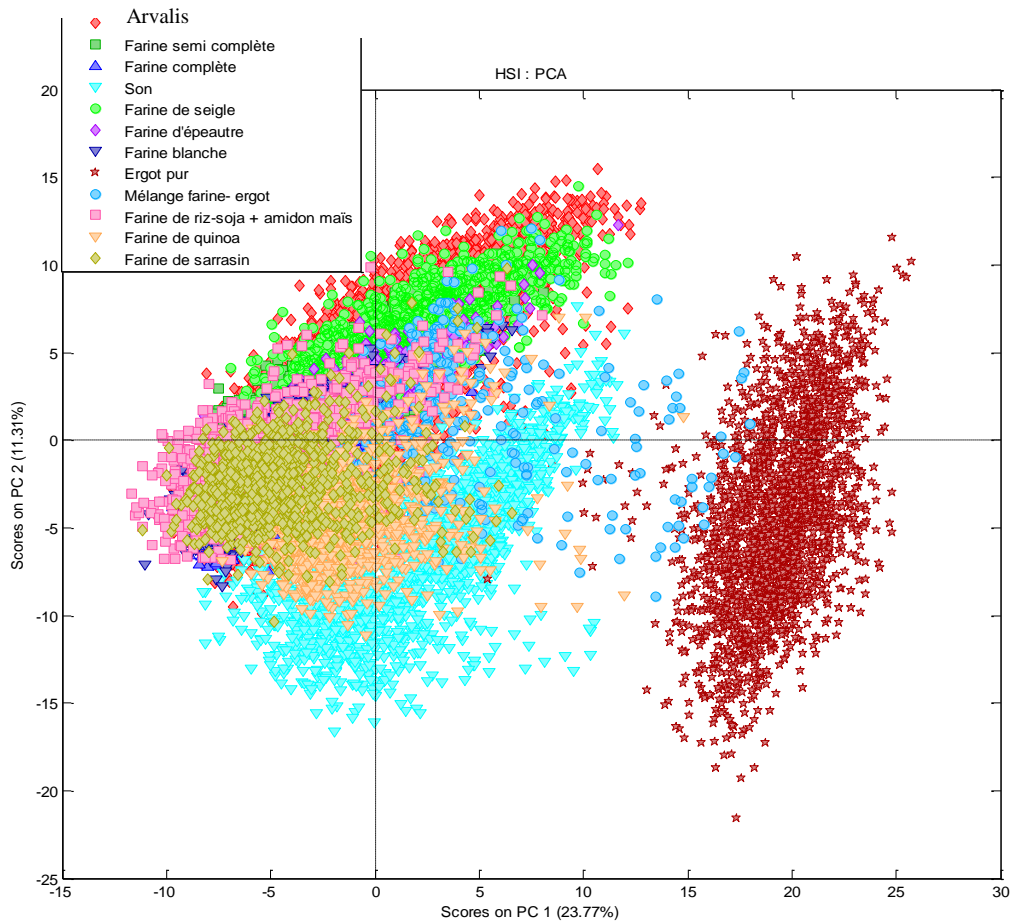
Pred = Prédiction, F= Farine, A= Alcaloïdes, T= Teneur en ergot, s = sem

Annexe 5 : Spectres moyens en imagerie proche infrarouge acquis avec le Burgermetrics line scan.



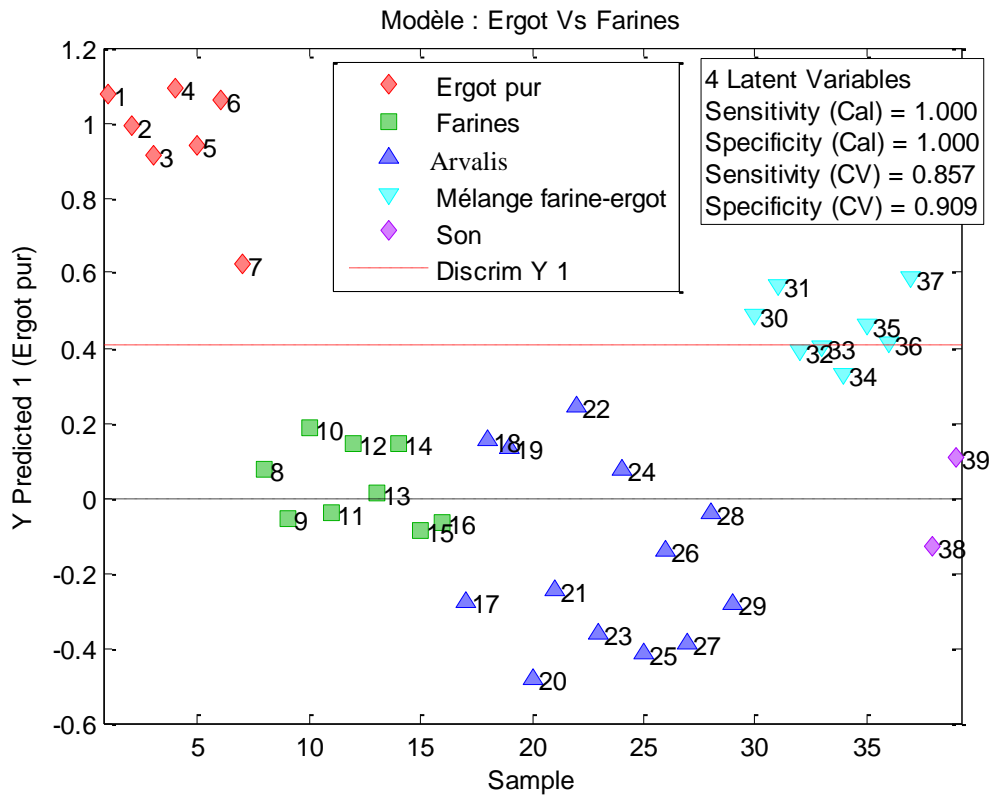
Comparaison du spectre moyen de l'ergot pur à celui du son, des autres farines de céréales, du mélange farine-ergot et des farines adultérées en ergot provenant de chez Arvalis et dénommées (Arvalis)

Annexe 6 : Analyse en composante principale (PCA) réalisée sur les spectres de particules de 39 échantillons acquis avec le Burgermetrics line scan. Score PC1/PC2.



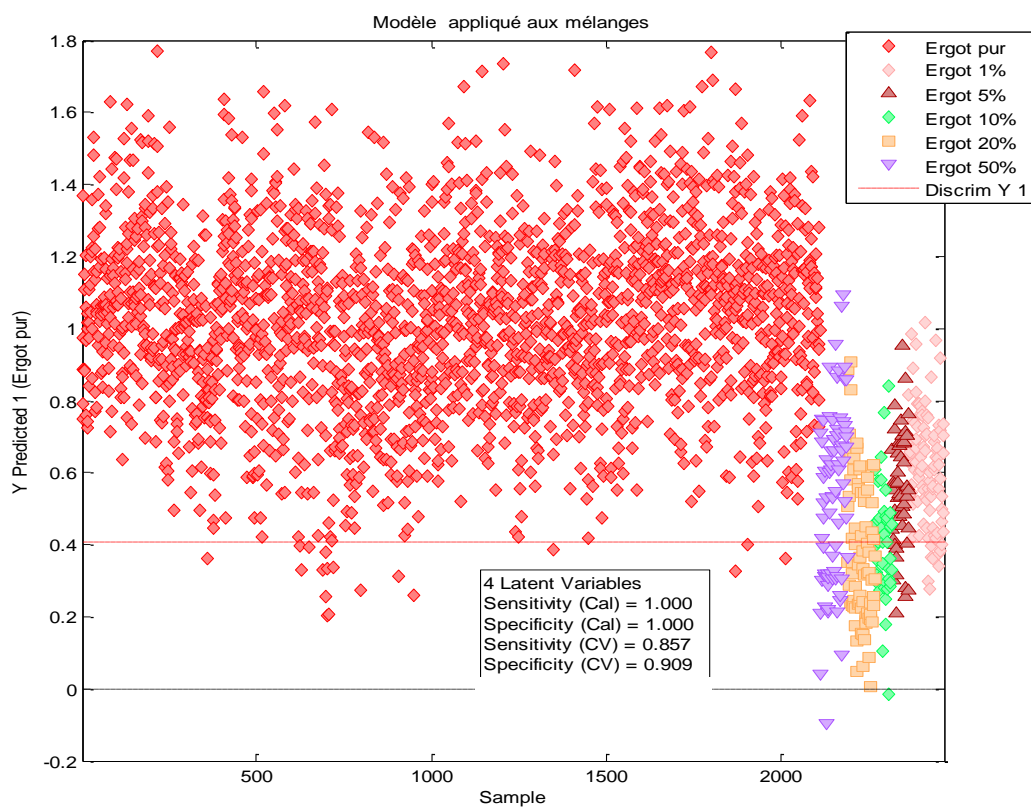
Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivative (5,2,1) et un autoscale. On observe une bonne discrimination des spectres de l'ergot pur des autres spectres. La composante principale 1 (PC1) explique 23,77 % de variabilité et la composante principale 2 (PC2) explique 11,31 % de variabilité.

Annexe 7 : Modèle « Ergot Vs Farines » réalisé sur les spectres moyens acquis avec le Burgermetrics line scan.



Pour réaliser ce modèle, les spectres ont été prétraités avec une SNV et une dérivée (5,2,1). La validation croisée appliquée est « leave-one-out »

Annexe 8 : Modèle « Ergot Vs Farines » appliqué sur les spectres de particules des mélanges farine-ergot.

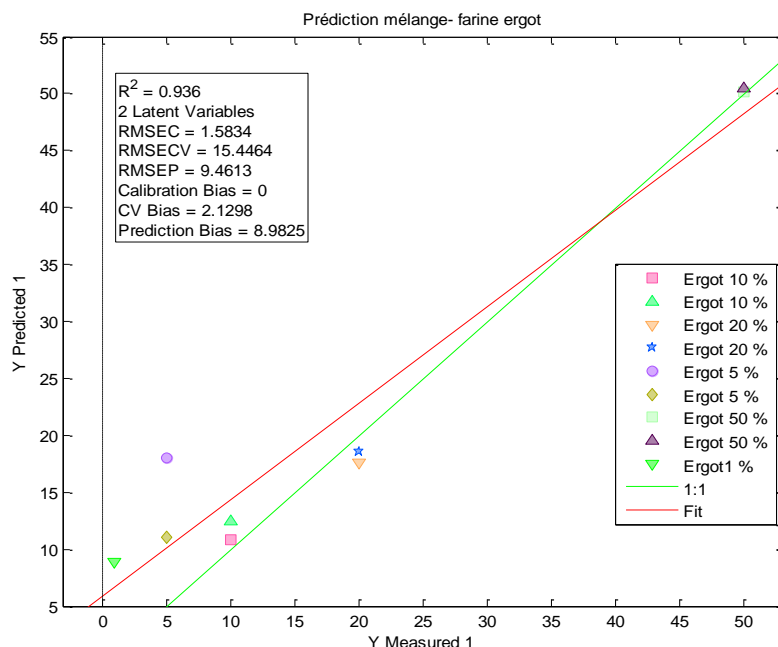


Annexe 9 : Matrices de confusion du modèle « Ergot Vs Farine »

Calibration						
Classe	NE	TP	FP	TN	FN	
Ergot	7	1	0	1	0	
Farines	11	1	0	1	0	
Validation croisée						
Classe	NE	TP	FP	TN	FN	
Ergot	7	0.85714	0.09091	0.90909	0.14286	
Farines	11	0.90909	0.14286	0.85714	0.09091	
Prédiction						
Classe	NE	TP	FP	TN	FN	
Ergot	7	1	0,66	0,33	0	
Farines	11	0,33	0	1	0,66	

NE : Nombre d'échantillon, TP (True Positive), FP (False Positive), TN (True Negative), FN (False Negative)

Annexe 10 : Prédiction des échantillons avec une teneur en ergot de 5 % et 1 %



Un modèle PLS a été construit avec pour set de calibration les spectres moyens de 7 échantillons. Les teneurs en ergot pour ces échantillons sont : 50 %, 20 % et 10 %. Les spectres sont prétraités avec une SNV, une dérivée (5,2,1) et un autoscale. Pour le set de validation, 3 spectres moyens ont été utilisés (deux spectres moyens de l'ergot à 5 % et un spectre de l'ergot à 1 %). Sur l'axe des abscisses sont représentées les valeurs mesurées. L'axe des ordonnées présente des valeurs prédites par le modèle. La Droite 1 : 1 est une droite de pente 1 passant par 0. Elle correspond à une relation parfaite entre les données prédites et mesurées. La droite « fit » est la droite tenant compte du set de calibration et de validation. R^2 = coefficient de détermination des sets de calibration et de prédiction. RMSEC= l'erreur quadratique moyenne de calibration, RMSECV = l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée, RMSEP = l'erreur quadratique moyenne de prédiction, Calibration biais = biais de calibration, CV biais = biais de la validation croisée, Prédiction biais = biais de la prédiction