



HAL
open science

Potentialités d'utilisation du nez électronique à spectromètre de masse pour la caractérisation de la fraction volatile du liège oenologique

Nawal Boudaoud

► **To cite this version:**

Nawal Boudaoud. Potentialités d'utilisation du nez électronique à spectromètre de masse pour la caractérisation de la fraction volatile du liège oenologique. Chemical Sciences. INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0006 . pastel-00001930

HAL Id: pastel-00001930

<https://pastel.hal.science/pastel-00001930>

Submitted on 28 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON



Ecole Doctorale ABIES

Laboratoire de Chimie Analytique

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Chimie analytique

Présentée et soutenue publiquement par

Nawal Boudaoud

Potentialités d'utilisation du nez électronique à spectromètre de masse
pour la caractérisation de la fraction volatile du liège oenologique

Directeur de thèse

Luc Eveleigh

Soutenue le 11 mai 2006 devant le jury suivant :

Rapporteurs : Mr Jean-Louis BERDAGUE (INRA)
Mr Antonio BARROS (Université d'Aveiro)

Examineurs : Mr Dominique TUSSEAU (Comité interprofessionnel du vin de
Champagne)
Mr Douglas RUTLEDGE (INA P-G)
Mr Luc EVELEIGH (INA P-G)

A Igor

*L'odorat, le mystérieux aide-mémoire, venait de faire
revivre en lui tout un monde.*

Victor Hugo, extrait de « Les Misérables ».

Remerciements

Les travaux présentés ici ont été réalisés au laboratoire de Chimie Analytique de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, actuellement dirigé par le professeur **Douglas Rutledge** et anciennement par le professeur **Christian Ducauze**. Je leur suis très reconnaissante de la confiance qu'ils m'ont témoignée en m'accueillant au sein du laboratoire et de l'opportunité qu'ils m'ont offerte de me former à la recherche. De plus, le professeur Douglas Rutledge me fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à **Luc Eveleigh**, maître de conférence au laboratoire pour l'encadrement et l'aide compétente qu'il m'a apportés. Sa patience et son soutien m'ont encouragé à mener ce travail à bon terme.

Messieurs **Jean-Louis Berdagué** et **Antonio Barros** m'ont fait un grand honneur en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse, aussi je leur témoigne toute ma reconnaissance. J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Dominique Tusseau** pour avoir accepté de participer à ce jury.

J'exprime à **Valérie Camel** toute mon amitié et ma gratitude pour m'avoir épaulée, encouragée et pour avoir grandement contribué à mettre en forme mon français très approximatif. Son œil critique, sans oublier celui de **Luc Eveleigh**, ont été précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

Plusieurs personnes m'ont également apporté leur aide. Je remercie tout particulièrement :

Tristan Boureau pour sa relecture clairvoyante de la partie introductive du manuscrit.

Delphine Bouveresse pour ses conseils avisés concernant l'analyse des données.

L'ensemble de l'équipe du laboratoire de pathologie végétale pour la sympathie et tout le soutien qu'ils m'ont témoigné avec un clin d'œil particulier pour certains d'entre eux que j'ai eu le plaisir de mieux connaître et avec qui j'ai partagé des repas, des cafés et bien d'autres choses... Je pense à **Tristan Boureau et Julien Capelle, Roberto Garcia, Benoît Alunni, Kamel Chibani, Aïda Boughamoura et Diego Segond.**

L'ensemble de mes collègues, amis et personnel du laboratoire (passés et présents) pour leur gentillesse, leur serviabilité et leur important appui dans les moments difficiles.

Enfin, je ne remercierai jamais assez ma famille : mes parents, mes frères (Rafik et Fayçal), mes beaux parents, mes sœurs de cœur (Helène et Delphine), mes proches de m'entourer de tant d'amour...et Igor.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES ANNEXES	10
GLOSSAIRE	11
INTRODUCTION	13
1 ANALYSE DES AROMES AGROALIMENTAIRES	15
1.1 L'ANALYSE SENSORIELLE	15
1.2 L'ANALYSE CHIMIQUE	16
1.2.1 L'analyse par chromatographie en phase gazeuse	16
1.2.2 Les capteurs ou « nez électroniques ».....	18
2 DOMAINE D'APPLICATION : LA FILIERE DU BOUCHON	33
2.1 LA DEMARCHE QUALITE DANS LA FILIERE	33
2.2 LE LIEGE	35
2.2.1 Origine et préparation du liège.....	36
2.2.2 Cycle de production du bouchon de liège	37
2.2.3 Le liège.....	39
2.2.4 Approches classiques pour l'analyse des composés volatils du bouchon de liège.....	45
2.3 CONCLUSION.....	48
3 NEZ ELECTRONIQUE A CAPTEURS IONIQUES BASE SUR UNE EXTRACTION PAR ESPACE DE TETE DYNAMIQUE	50
3.1 MATERIELS ET METHODES	50
3.1.1 Origine et préparation des échantillons.....	50
3.1.2 Le DHS-MS : appareillage utilisé	52
3.1.3 Le DHS-GC-MS : appareillage utilisé	55
3.1.4 Méthodes statistiques utilisées	56
3.2 ETUDE PRELIMINAIRE DE MISE AU POINT DU DHS-MS	60
3.2.1 Analyse préliminaire de la fraction volatile du liège par DHS-GC-MS.....	60
3.2.2 Analyse préliminaire de la fraction volatile du liège par DHS-MS	65
3.3 EVALUATION DU POTENTIEL DISCRIMINANT DES EMPREINTES OBTENUES PAR DHS-MS.....	76

3.3.1	<i>Etude de caractérisation des origines géographiques des bouchons de liège œnologique espagnols, portugais et marocains par DHS-MS</i>	76
3.3.2	<i>Etude de caractérisation de l'empreinte globale de bouchons de liège œnologique présentant cinq intensités de défauts olfactifs par DHS-MS</i>	87
3.3.3	<i>Discussion générale sur ces études de caractérisation par DHS-MS</i>	97
3.3.4	<i>Conclusion sur le pouvoir discriminant du système DHS-MS</i>	99
4	–NEZ ELECTRONIQUE A CAPTEURS IONIQUES BASE SUR UNE EXTRACTION PAR MICROEXTRACTION EN PHASE SOLIDE	100
4.1	MATERIELS ET METHODES	101
4.1.1	<i>Origine et préparation des échantillons</i>	101
4.1.2	<i>Le SPME-MS : appareillage</i>	102
4.1.3	<i>Le SPME-GC-MS : appareillage</i>	103
4.2	ANALYSE PRELIMINAIRE PAR SPME-GC-MS.....	104
4.2.1	<i>Choix de la nature de la fibre</i>	104
4.2.2	<i>Choix de la durée d'exposition de la fibre</i>	105
4.2.3	<i>Tentative d'identification par SPME-GC-MS des composés volatils du liège</i>	106
4.3	MISE AU POINT DU TANDEM SPME – MS	108
4.3.1	<i>Choix de la température de l'échantillon</i>	109
4.3.2	<i>Conclusion</i>	110
4.4	EVALUATION DU POTENTIEL DISCRIMINANT DES EMPREINTES OBTENUES PAR SPME-MS	110
4.4.1	<i>Les données de SPME-MS</i>	110
4.4.2	<i>L'analyse de ces données</i>	111
5	CONCLUSION : DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES	117
5.1	EXTRACTION - CONCENTRATION ET TRANSFERT DES VOLATILS	117
5.1.1	<i>DHS</i>	117
5.1.2	<i>SPME</i>	118
5.2	LE DETECTEUR DE MASSE	118
5.3	APPLICATION A LA CARACTERISATION DU LIEGE	119
	ANNEXES	122
	ANNEXE 1	123
	ANNEXE 2	132
	ANNEXE 3	134
	BIBLIOGRAPHIE	145
	RESUME	155
	ABSTRACT	156
	ABSTRACT	157

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples d'application agroalimentaire des techniques de caractérisation par capteurs ioniques.....	31
Tableau 2 : Les principales molécules impliquées dans les mauvais goûts.....	42
Tableau 3. Origine des échantillons pour la caractérisation de l'origine géographique, et nombre de répétition des analyses.....	51
Tableau 4. Nombre de répétitions réalisées pour les échantillons de rondelles de liège présentant un défaut de moisi.....	52
Tableau 5. Résultats de la tentative d'identification des composés volatils et semi-volatils du liège.....	63
Tableau 6. Moyenne, écart type et coefficient de variation des aires des pics en fonction de la durée d'extraction du DHS-MS.....	71
Tableau 7. Influence de la granulométrie des échantillons sur la répétabilité du signal du DHS-MS.....	74
Tableau 8. Estimation de la stabilité du signal du DHS-MS par une étude de variance.....	75
Tableau 9. Les paramètres expérimentaux du DHS-MS à l'issue de l'étude de mise au point de l'instrument.....	75
Tableau 10. Les fragments (m/z) ayant le plus haut hautement contribué aux composantes principales ainsi que leur probable origine chimique.....	81
Tableau 11. Origine et effectif des échantillons.....	101
Tableau 12. Tentative d'identification des composés volatils et semi-volatils du liège par SPME-GC-MS	107
Tableau 13. Moyenne, écart type et coefficient de variation des aires des pics en fonction de la température de l'échantillon en mode SPME-MS.....	109
Tableau 14. Les paramètres expérimentaux de la SPME-MS à l'issue de l'étude de mise au point de la méthode.....	110

Liste des figures

Figure 1. Schéma d'un couplage GC-O.	17
Figure 2. Exemple d'un aromagramme.	18
Figure 3. Organisation du système olfactif humain.	19
Figure 4. Le codage nerveux des odeurs chez l'homme.	20
Figure 5. Principe des « nez électroniques » : (a) capteurs de gaz, (b) capteurs ioniques 22	22
Figure 6. Principe de mise en œuvre de l'espace de tête statique par pressurisation et remplissage d'une boucle d'échantillonnage.	24
Figure 7. Principe de mise en œuvre de l'espace de tête dynamique.	25
Figure 8. Principe de mise en œuvre de la SPME par espace de tête.....	26
Figure 9. Répartition mondiale des suberaies.	36
Figure 10 : Le cycle de production du liège œnologique.	37
Figure 11. Dispositif instrumental pour le système DHS-MS.	53
Figure 12. Chromatogramme d'un échantillon de liège obtenu par DHS-GC-MS.....	63
Figure 13. Spectre de masse de la vanilline 64	64
Figure 14. (a) Courant ionique total (TIC) correspondant à un blanc d'analyse à une pression de 0,2 bar. (b) (c) (d) TIC d'échantillons acquis respectivement à des pressions en tête de colonne de 0,2 ; 0,6 et 1 bar.	66
Figure 15. Pseudochromatogramme de l'ion 151 issu d'un échantillon de liège test, à une température de piégeage de 0°C et de -10°C.	68
Figure 16. Pseudochromatogramme de l'ion 151 issu d'un échantillon de liège test, (a) avec un conditionnement du piège à l'air comprimé, (b) sans conditionnement du piège.....	69
Figure 17. Histogramme présentant les résultats d'intégration du TIC pour un piège refroidi à l'air comprimé (environ 17°C) et un piège non refroidi (environ 40°C) et leur écart types respectifs calculé pour cinq répétitions.	69
Figure 18. Effet de la durée de l'extraction sur la quantité de matière extraite par DHS-MS. La moyenne des aires et les écarts types calculés pour 3 répétitions sont représentés en fonction de la durée de l'extraction.	71

Figure 19. Effet de la température d'extraction sur la quantité de matière extraite par DHS-MS. La moyenne des aires et les écarts types calculés pour 3 répétitions sont présentés en fonction de la température d'extraction.	72
Figure 20. Influence de la granulométrie des échantillons sur la quantité de matière extraite du signal du DHS-MS. La moyenne et l'écart types des aires des pics de désorptions de cinq répétitions sont présentés en fonction de la taille des particules de liège.	73
Figure 21. Courant ionique total d'un échantillon de liège portugais (P1) obtenu par DHS-MS.	77
Figure 22. Projection tridimensionnelle des individus sur les composantes principales de l'ACP appliquée aux signaux des échantillons de liège espagnols (E1 et E2), portugais (P1 et P2) et marocains (M), réunis dans la matrice \mathbf{Xc}	79
Figure 23. Vecteurs propres associés à PC1, PC2 et PC5.	80
Figure 24. Projection des valeurs prédites des individus de \mathbf{Xc} (\diamond) et de \mathbf{Xv} (\blacklozenge) sur les trois axes des valeurs à prédire de chaque groupe d'origine géographique.	84
Figure 25. Projection tridimensionnelle de l'ACP des individus espagnols (E1 et E2), portugais (P1 et P2) et marocains (M) à partir de la matrice réduite $\mathbf{X_R}$ (51 x 32).	85
Figure 26. Vecteurs propres associés à PC1, PC2 et PC4.	86
Figure 27. Empreinte spectrale d'un échantillon de liège portugais ayant une intensité 4 de moisi et obtenu par DHS-MS.	88
Figure 28. Projection tridimensionnelle des individus sur PC1, PC3 et PC5 de l'ACP appliquée à la matrice \mathbf{X} (66 x 171) (les numéros 0 à 4 correspondant aux intensités de défaut de moisi des échantillons de liège).	90
Figure 29. Vecteurs propres associés à PC1, PC3 et PC5.	91
Figure 30. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à \mathbf{X} (66 x 171).	92
Figure 31. Droite de régression entre les valeurs observées (valeurs à prédire) et les valeurs prédites par le modèle PLS mis à jour pour les échantillons d'étalonnage (a) et de validation (b).	94
Figure 32. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à $\mathbf{X_2}$	95
Figure 33. Droite de régression entre les valeurs observées (valeurs à prédire) et les valeurs prédites par le modèle PLS sur la matrice $\mathbf{X_{ani}}$ (76 x 72) et \mathbf{Y} (76 x 1).	96
Figure 34. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à $\mathbf{X_{ani}}$	97
Figure 35. Moyenne et écart type des pics chromatographiques obtenus pour les deux fibres testées.	104

Figure 36. Chromatogramme moyen et écart type des trois répétitions effectuées pour chacune des durées d'exposition de la fibre de PDMS suivantes : 5, 10 et 15 minutes d'exposition.....	106
Figure 37. Chromatogramme d'un échantillon de planche de liège obtenu avec une fibre de PDMS et par SPME-GC-MS. Les flèches rouges indiquent les pics de polysiloxanes de la fibre.	107
Figure 38. Courant ionique total (TIC) d'un échantillon de liège espagnol (région de Cadiz) dans la configuration du nez électronique à capteurs ioniques (SPME-MS).....	108
Figure 39. Moyenne des aires obtenues par SPME-MS et leurs écarts types respectifs pour chacune des températures de l'échantillon étudiées.....	109
Figure 40. Empreinte spectrale d'un échantillon de liège d'origine marocaine de la région de Dhar Daman constituée de 171 fragments de masse.....	111
Figure 41. Projection des individus sur PC1 (33,90 %) et PC2 (20,23 %) de l'ACP appliquée à la matrice X (154 x 171).	112
Figure 42. Projection des individus sur PC1 et PC4 de l'ACP appliquée à la matrice X mince (134 x 171).	113
Figure 43. Projection des échantillons de X (154 x 171) dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne « S », (G2) valeur prédite du groupe Portugal « P », (G3) valeur prédite du groupe Maroc « M ».....	114
Figure 44. Projection des échantillons de X mince (134 x 171) dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne « S », (G2) valeur prédite du groupe Portugal « P », (G3) valeur prédite du groupe Maroc « M ».....	115
Figure 45. Projection des échantillons dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne «atlantique» (Ea), (G2) valeur prédite du groupe Portugal «atlantique» (Pa), (G3) valeur prédite du groupe Maroc «atlantique» (Ma).	116

Liste des annexes

Annexe 1	123
Annexe 2	132
Annexe 3	134

Glossaire

ACP : analyse en composantes principales

a.m.u. (atomic mass units) : unités de masse atomique

PC : composantes principales (*principal components*)

CV : coefficient de variation relatif à la moyenne

DHS (*Dynamic HeadSpace*) : espace de tête dynamique

DHS-MS (*Dynamic Headspace–Mass Spectrometry*) : espace de tête dynamique–spectrométrie de masse (nez électronique à capteur ionique)

GC : chromatographie en phase gazeuse

GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) : chromatographie en phase gazeuse–spectrométrie de masse

MOS : oxyde métalliques conducteurs

MS : spectromètre de masse

m/z : rapport masse/charge

O : olfactométrie

PCA : pentachloroanisole

Pcond : polymère conducteur

PDMS : polydiméthyl-siloxane

PLS (*Partial Least Squares*) : régression des moindres carrés partiels

SEC (*Standard Error of Calibration*) : erreur standard d

SPME (*Solid Phase Microextraction*) : microextraction en phase solide

TCA : 2,4,6-trichloroanisole

TeCA : 2,3,4,6-tétrachloroanisole

TIC (*Total Ion Current*) : courant ionique total

Introduction

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de chimie analytique de l'institut National Paris-Grignon et a donné lieu à une collaboration avec l'entreprise Sabaté spécialisée dans la fabrication du bouchon œnologique et qui est le 2^{ème} producteur mondial de liège.

Les travaux exposés dans ce document explorent les potentialités d'une nouvelle approche analytique rapide pour l'étude de la fraction volatile du liège œnologique : le nez électronique à spectromètre de masse. La réponse analytique des nez électroniques à spectromètre de masse est une empreinte digitale composée de la superposition des spectres de masse des composés introduits simultanément dans la source du détecteur de masse. Cette empreinte peut être reliée aux caractéristiques de l'échantillon par des méthodes statistiques d'analyse de données. L'établissement de ce lien mathématique requiert une phase d'apprentissage au cours de laquelle des échantillons de caractéristiques connus sont soumis à l'appareil. Ainsi, dans ce présent travail, les empreintes olfactives des échantillons obtenus par espace de tête dynamique-spectrométrie de masse (DHS-MS) et par microextraction en phase solide-spectrométrie de masse (SPME-MS), ont été exploitées à des fins de classification et de prédiction de l'origine et de la qualité des échantillons de liège.

Ce mémoire s'articule autour de 4 parties principales :

La première partie est consacrée à la présentation du contexte bibliographique de l'étude à savoir l'avènement des méthodes de caractérisation rapides par spectrométrie de masse, face aux limites des méthodes classiquement employées à l'étude des arômes agroalimentaires. A ce titre, nous avons détaillé les différentes techniques d'extraction des composés volatils ainsi que leur détection par spectrométrie de masse. Les stratégies de mise en œuvre de ces techniques ainsi que les méthodes d'exploitation de ce type de données ont ensuite été exposés. Enfin après une présentation de la filière du bouchon œnologique nous avons évoqué la nécessité de mise en œuvre de méthodes rapides basées sur un spectromètre de masse pour cette application.

La deuxième partie présente la mise en œuvre du couplage d'un espace de tête dynamique – spectromètre de masse, incluant une étape préliminaire de mise au point suivie de l'application de cette technique, à travers deux études de caractérisation des composés volatils du liège. Dans la première étude nous avons cherché à caractériser l'origine géographique de

rondelles de liège champenoises. Dans la seconde étude, nous avons cherché à détecter les défauts olfactifs de rondelles de liège. Les résultats de ces deux études ont été confrontés à ceux de méthodes de références classiques telles que la chromatographie en phase gazeuse et l'analyse sensorielle.

La troisième partie présente la possibilité d'utilisation du couplage microextraction en phase solide -spectrométrie de masse (SPME-MS) pour la caractérisation de l'origine géographique de planches de lièges brutes. Comme pour le système DHS-MS, nous avons procédé en deux étapes, avec une mise au point préliminaire, suivie d'une évaluation du potentiel discriminant des empreintes obtenues par SPME-MS.

La quatrième partie est une discussion générale sur les perspectives et les limites des nez électroniques à capteurs ioniques, basée sur les résultats obtenus dans ce travail.

1 Analyse des arômes agroalimentaires

Il existe actuellement une forte demande d'actions de recherche dans le domaine de la caractérisation des matières premières et des aliments. Souvent initiée par les consommateurs, cette demande a été relayée par les filières agroalimentaires. Si la qualité d'un produit alimentaire dépend en premier lieu de caractéristiques physiques, chimiques, nutritionnelles ou encore bactériologiques, les produits doivent répondre également aux attentes sensorielles des consommateurs. Parmi les aspects sensoriels, la dimension olfactive joue un rôle important et rend le contrôle de l'odeur, à travers l'étude des composés volatils, primordial pour l'évaluation de la qualité des produits. Les techniques classiques permettant de caractériser la dimension olfactive des produits sont, d'une part, l'analyse sensorielle et, d'autre part, l'analyse chimique. Cette première partie est consacrée à l'exposé de l'état de l'art de ces deux techniques.

1.1 L'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est un outil puissant employé en industrie agroalimentaire, outre l'analyse chimique, pour évaluer la qualité d'un produit. L'évaluation sensorielle est une méthode qui consiste à décrire l'ensemble des caractéristiques organoleptiques du produit agroalimentaire, grâce à un panel d'experts entraînés à cette tâche. Pour la description sensorielle des produits, le panel définit un ensemble de descripteurs rigoureusement choisis pour leur pertinence et assortis chacun d'une note. L'ensemble des descripteurs ainsi mis au point et quantifiés constitue le profil sensoriel du produit (SSHA, 1998). Grâce à leurs profils, les produits peuvent être positionnés les uns par rapport aux autres. Les profils sensoriels peuvent également être corrélés à des données consommateurs dans le but par exemple de traduire l'acceptation ou le rejet du consommateur face au produit ou à des données instrumentales dans le but par exemple de relier les caractéristiques physico-chimiques du produit à son profil sensoriel (Huon De Kermaec, 1996).

Cependant, la mise en place d'un jury d'experts demande un travail considérable avant d'effectuer des évaluations fiables et objectives. Le recrutement et l'entraînement du groupe de panélistes représentent un investissement long et coûteux. De plus, les performances des panélistes peuvent être affectées par différents facteurs externes tels que la maladie, le stress,

etc. Toutefois, l'analyse sensorielle reste actuellement la méthode de choix couramment employée en industrie agroalimentaire, pour l'analyse des odeurs.

1.2 L'analyse chimique

L'analyse chimique des arômes alimentaires fait le plus souvent appel à une séparation des molécules volatiles par chromatographie en phase gazeuse, couplée soit à la spectrométrie de masse (GC-MS), soit à l'olfatométrie (GC-O). Ces deux types de couplage sont détaillés dans cette partie. Plus récemment sont apparues des techniques sans séparation préalable des composés volatils, connues sous le nom de « nez électroniques » ; elles sont également présentées ci-dessous.

1.2.1 L'analyse par chromatographie en phase gazeuse

1.2.1.1 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Elle est fondée sur la séparation des constituants présents dans un mélange odorant. Elle fournit deux informations : d'une part, quantitative, car une séparation préalable des produits facilite la détermination de leur concentration et, d'autre part, qualitative en identifiant chaque composé à partir de son spectre de masse spécifique. Son emploi depuis les années 1980 a révolutionné le monde de la chimie analytique et en particulier les secteurs dédiés à l'étude des arômes. Actuellement, cette méthode continue à faire ses preuves dans le domaine de l'agroalimentaire mais aussi dans bien d'autres domaines tels que l'environnement, la pétrochimie, la cosmétique etc. Cependant, cette approche présente une limite majeure en dehors même de considérations économiques et de sa longueur de mise en œuvre. Cette technique ne permet pas de déterminer la nature de l'odeur globale telle qu'elle est perçue lors d'une analyse sensorielle (Rocha *et al.*, 1996 ; Riu *et al.*, 2002). En effet, elle ne tient pas compte des synergies ou des antagonismes qui peuvent exister entre les composés présents dans le mélange odorant. Par ailleurs, l'intensité d'une odeur n'est pas toujours proportionnelle à la concentration d'un ou de plusieurs composés. Il est courant qu'une molécule présente en très faible quantité soit responsable d'une odeur très intense et très caractéristique comme c'est le cas du 2,4,6-trichloroanisole dans le vin. A l'inverse, il arrive souvent qu'une molécule ayant un pic chromatographique intense ne soit responsable d'aucune odeur.

1.2.1.2 La chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (GC- O)

La chromatographie couplée à l'olfactométrie peut apporter des réponses à la question de pouvoir olfactif des molécules analysées en fonction de leur intensité (Priser *et al.*, 1998). Son principe est le suivant : en sortie de colonne capillaire l'éluat gazeux est divisé en deux parties. Une partie est dirigée vers un détecteur (par exemple un spectromètre de masse ou un détecteur à ionisation de flamme) et l'autre partie vers un olfactomètre. Au niveau de l'olfactomètre (Figure 1), des sujets sélectionnés pour leurs capacités olfactives sentent les composés au fur et à mesure de leur élution. Ils peuvent ainsi assigner des caractéristiques olfactives ou des descripteurs olfactifs à chaque pic chromatographique, avec des sensibilités pouvant atteindre les parties par milliard (10^{-9}) voire, dans certains cas, les parties par billion (10^{-12}). Les résultats issus de la GC-O sont représentés dans un aromagramme (Figure 2) : il s'agit d'un graphique représentant un profil chromatographique sur lequel est noté, pour chacun des pics, le descripteur d'arôme qui lui correspond. Cette approche permet de distinguer les composés ayant une contribution aromatique de ceux qui n'en n'ont pas.

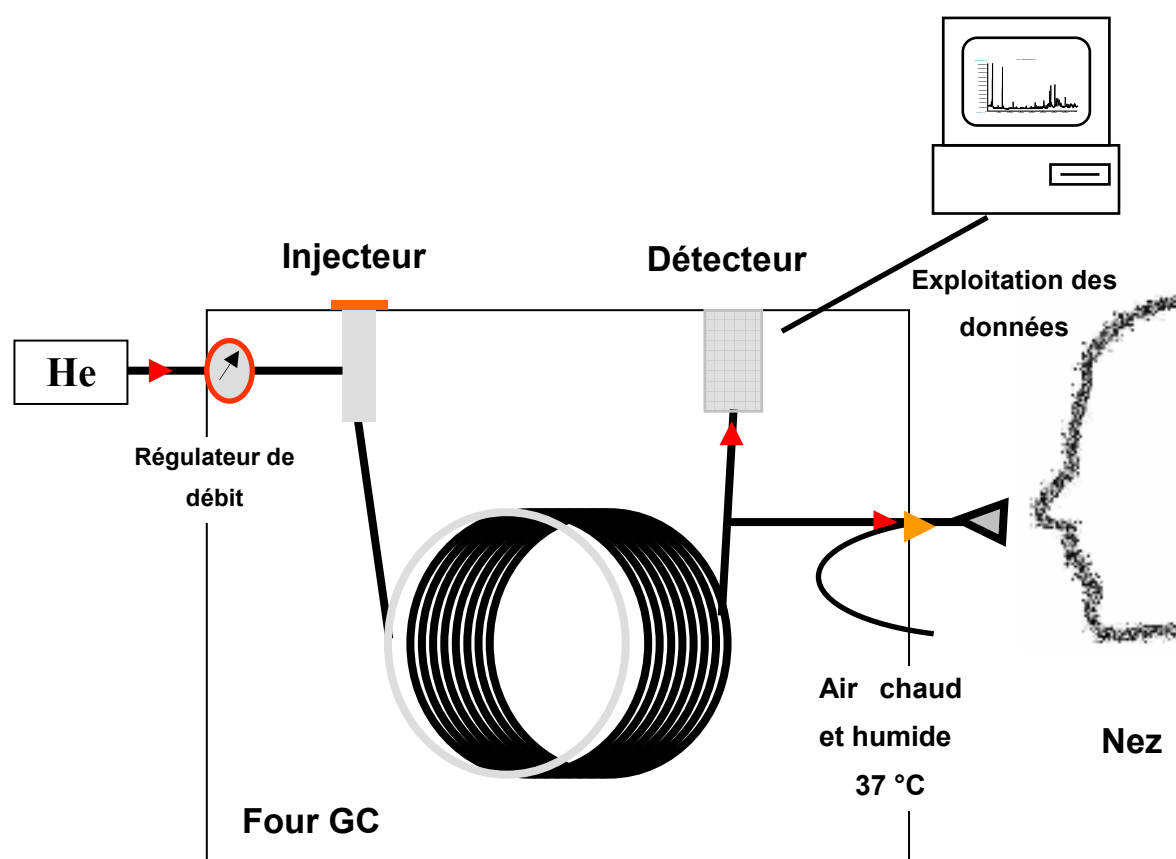


Figure 1. Schéma d'un couplage GC-O.

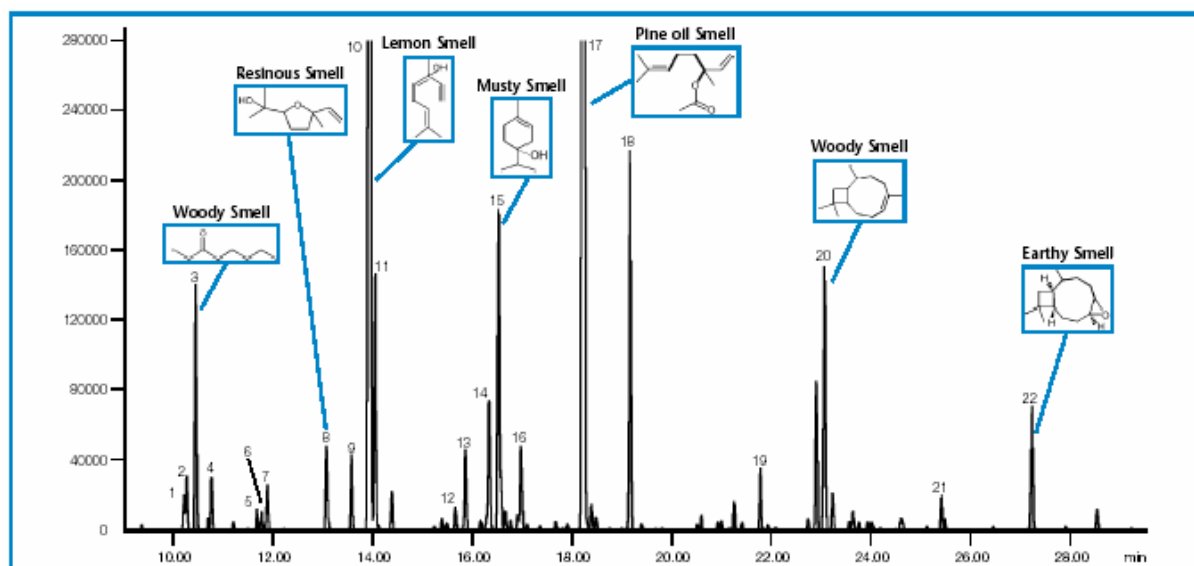


Figure 2. Exemple d'un aromagramme.

Néanmoins, comme dans le cas de la GC-MS, le problème de la globalité de l'odeur perçue reste posé. Ce problème est connu des parfumeurs et des synthétiseurs d'arômes alimentaires : un composé isolé ne peut restituer la qualité d'un parfum complexe en raison des synergies et des antagonismes qui existent entre les molécules volatiles d'un mélange odorant (MacLeod *et al.*, 1986 ; Pearce *et al.*, 1998).

1.2.2 Les capteurs ou « nez électroniques »

Pour appréhender les arômes dans leur globalité et pour pallier les limites de la méthode sensorielle et des méthodes chimiques décrites ci-dessus, de nouvelles techniques voient le jour depuis quelques années : les capteurs électroniques. On distingue deux types de « nez électroniques » : les nez à capteurs de gaz, qui sont apparus en premier lieu, et les nez à capteurs ioniques dont la technologie est plus récente.

1.2.2.1 Les nez à capteurs de gaz

Cette technique a vu le jour au début des années 90, grâce aux différents progrès enregistrés dans l'informatique, dans l'électronique et dans les capteurs de gaz (Ihokura *et al.*, 1994). Les nez ont été fabriqués dans le but, soit de remplacer l'analyse sensorielle, soit de l'assister (Gardner *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'olfaction est liée à la stimulation du système olfactif par l'ensemble des molécules odorantes émises par l'objet flairé. Les composés volatils s'élèvent jusqu'à la cavité nasale et à son épithélium olfactif. Les molécules olfactives peuvent aussi atteindre l'épithélium olfactif par la voie rétronasale lors de l'ingestion d'un aliment (Figure 3). L'épithélium olfactif est recouvert d'un fin mucus et possède plusieurs

millions de cellules réceptrices (neurorécepteurs olfactifs) dotées de cils et sur les membranes desquelles se trouvent des protéines chimioréceptrices (Laing *et al.*, 1996). Le nombre de ces protéines membranaires est de quelques milliers chez les mammifères. Elles ont des sensibilités qui se recoupent puisque chaque protéine possède un site de reconnaissance pour un sous-ensemble de molécules odorantes et les sites de reconnaissances peuvent aussi être commun à plusieurs protéines.

Lorsque les protéines chimioréceptrices réagissent avec les molécules flairées, il s'ensuit des réactions physiologiques en chaîne qui engendrent une dépolarisation de la membrane des cellules réceptrices. La dépolarisation de la membrane génère alors un signal électrique (potentiel d'action) le long des axones des mêmes cellules réceptrices, puis se propage jusqu'aux glomérules du bulbe olfactif. Les glomérules du bulbe olfactif se présentent comme une juxtaposition de synapses-relais entre environ 25 000 neurones olfactifs « entrants » et 25 neurones « sortants » de chaque glomérule (cellules dites mitrales) (Figure 4). L'activation d'une zone du bulbe olfactif (d'un certain nombre de glomérules) donne une image olfactive spécifique (visualisée par une « tache allumée » en imagerie médicale). Ces images sont transmises vers le cortex olfactif, siège de processus complexes de reconnaissance de forme mettant en jeu la mémoire et intégrant d'autres processus complexes de discrimination (réactions émotionnelles et comportementales) (MacLeod *et al.*, 1986 ; Nicolas-Saint Denis, 1999).

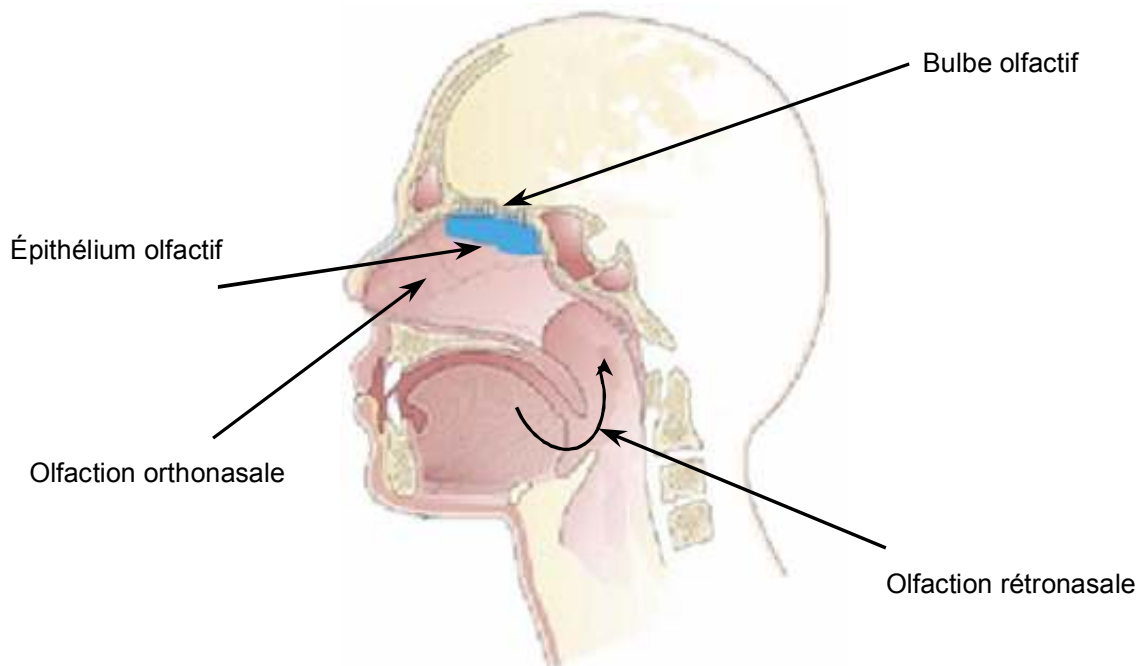


Figure 3. Organisation du système olfactif humain.

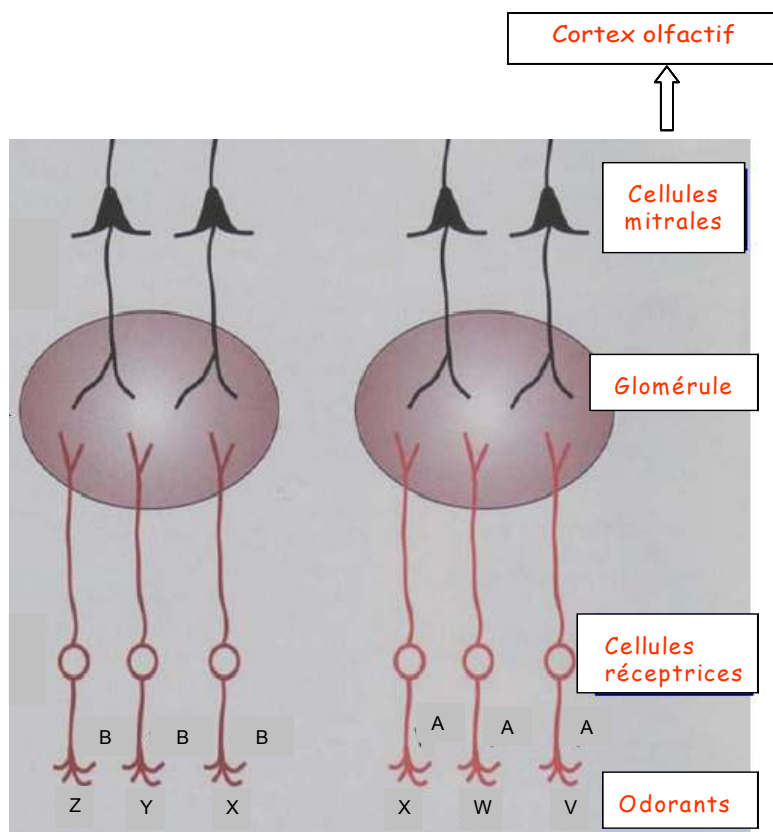


Figure 4. Le codage nerveux des odeurs chez l'homme.

L'objectif des capteurs de gaz est de mimer le processus complexe de l'olfaction humaine (Shermer, 1990). Pour cela, un espace de tête est généré au-dessus de l'échantillon à analyser. Les composés volatilisés interagissent avec une batterie constituée de n capteurs ($8 < n < 32$) peu spécifiques (Figure 5). Chaque capteur fournit un signal électrique lorsque les molécules volatiles s'y adsorbent. Les n signaux émis correspondent à une empreinte spécifique de l'odeur. Ces empreintes sont traitées grâce à des méthodes statistiques appropriées permettant d'établir des modèles de reconnaissance du mélange odorant. Les capteurs de gaz présentent l'avantage de caractériser le mélange odorant dans sa globalité et ils fournissent des réponses de plusieurs secondes, voire de plusieurs dizaines de secondes. Les caractéristiques essentielles du nez humain que les capteurs électroniques visent à reproduire sont donc outre la rapidité de la réponse (au moins en comparaison avec la GC), celles d'avoir des capteurs qui ont des sensibilités partielles qui se recoupent et qui émettent un signal électrique lorsque les molécules volatiles s'y adsorbent. Les signaux émis subissent à leur tour, plusieurs types d'analyses statistiques multidimensionnelles afin d'aboutir à un système de classification ou de reconnaissance.

Différents types de capteurs de gaz existent sur le marché. Ils peuvent être classés en deux catégories: les capteurs chauds fonctionnant à des températures allant de 175 à 450°C, et les capteurs froids fonctionnant à des températures inférieures à 50°C (Mielle, 1998 ; Schaller *et al.*, 1998). Parmi les capteurs chauds, ce sont les oxydes métalliques conducteurs (MOS) qui sont les plus répandus car ils sont sensibles à une large gamme de vapeurs organiques (Strike *et al.*, 1999). Ce sont des capteurs formés d'un support en céramique chauffé et revêtu d'un film d'oxydes métalliques semi-conducteur à base d'oxyde de zinc ou d'oxyde d'étain dopés à divers métaux (palladium, platine, etc.). Chaque combinaison oxyde/dopant apporte une sensibilité différente : certains sont plus sensibles aux aldéhydes, d'autres aux composés soufrés, etc. Le principe est le suivant : dans une atmosphère dotée d'oxygène (air ambiant), les molécules de dioxygène adsorbées à la surface, attirent les électrons de la bande de conductivité du capteur : il en résulte une faible conductivité. Si, par la suite, des molécules volatiles se mettent en contact du capteur, alors un transfert de charge s'opère entre les composés volatils et l'oxygène adsorbé à la surface du capteur. Il en résulte une augmentation de la conductivité du capteur, augmentation qui fonde la mesure. Ces capteurs sont relativement peu sensibles à l'humidité. Cependant, les MOS sont sensibles à l'éthanol et, dans le cas de l'analyse de boissons alcoolisées, cela peut masquer les autres composés volatils d'intérêt. De plus, lors de leur utilisation, des effets mémoires dus aux adsorptions irréversibles, surtout vis-à-vis de composés soufrés et des acides faibles, ont été constatés. Enfin, les hautes températures requises par les MOS rendent leur utilisation inappropriée dans des environnements contenant des produits chimiques potentiellement inflammables (Schaller *et al.*, 1998 ; Pilar Marti *et al.*, 2005).

Parmi les capteurs froids, ce sont les polymères conducteurs (PCond) qui sont les plus largement employés car, comme les MOS, ils sont sensibles à une large gamme de vapeurs organiques. Les PCond sont obtenus par déposition électrochimique d'un polymère (polypyrrole ou polyaniline) entre deux électrodes plaqués d'or. Lorsque les composés volatils sont adsorbés à la surface du polymère, sa conductivité varie. La réponse du PCond est la mesure de cette variation. L'utilisation de ce type de capteur pose des problèmes liés à leur sensibilité à l'humidité (Pilar Marti *et al.*, 2005).

En dépit des nombreuses applications des capteurs de gaz dans le domaine de l'agroalimentaire (Costa Freitas *et al.*, 2001 ; Buratti *et al.*, 2004 ; Santos *et al.*, 2004 ; Berna *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2005), les capteurs de gaz souffrent encore de problèmes de dérive instrumentale et de manque de reproductibilité. Cette instabilité compromet l'utilisation des

bases de données qu'ils permettent de construire en vue de la reconnaissance de formes olfactives (Pillonel *et al.*, 2002a ; Pilar Marti *et al.*, 2005).

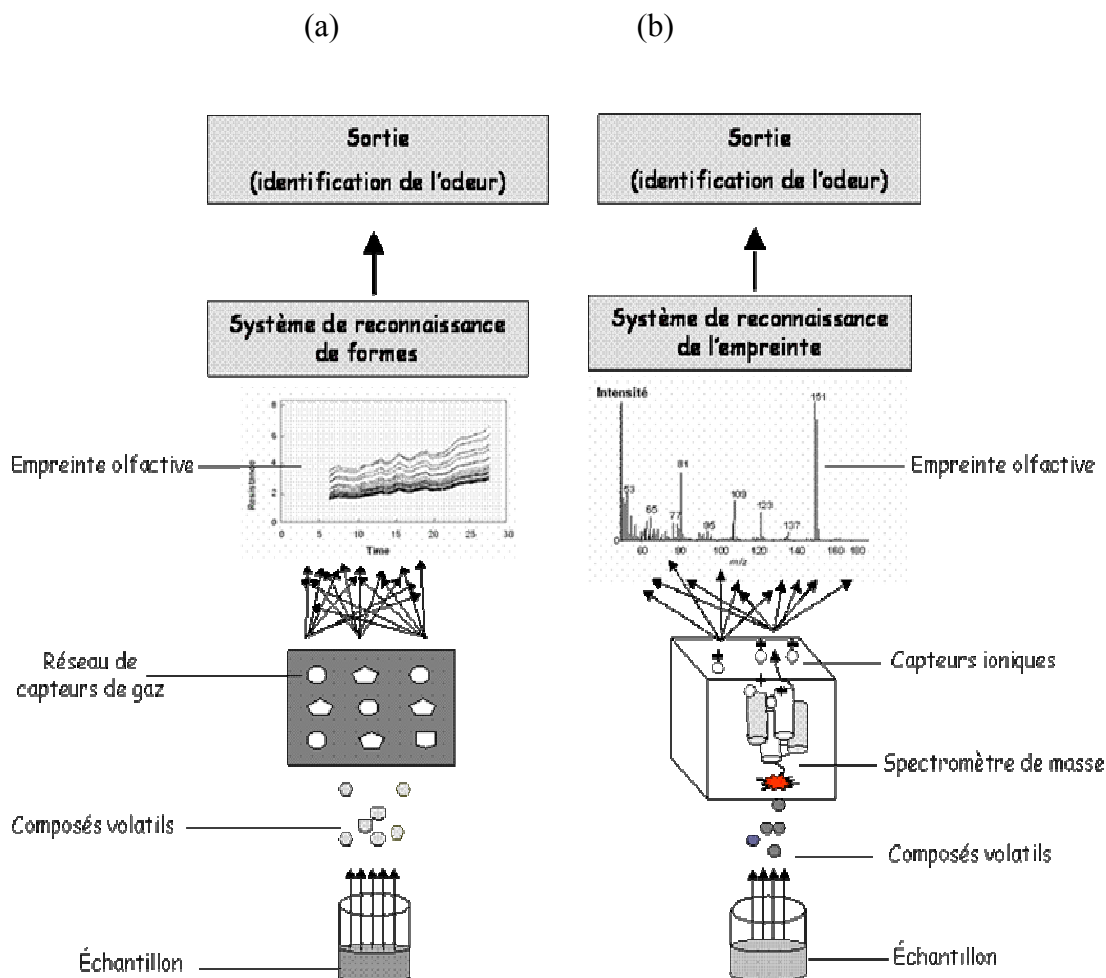


Figure 5. Principe des « nez électroniques » : (a) capteurs de gaz, (b) capteurs ioniques

1.2.2.2 Les capteurs ioniques : "nouvelle génération de nez électroniques"

Pour une analyse globale et rapide des composés volatils, et face aux limites que connaissent les méthodes d'analyse classiques des odeurs (GC-MS, GC-olfactométrie et capteurs de gaz classiques), une alternative a été proposée : il s'agit des capteurs ioniques. Des recherches récentes dans le domaine de l'agroalimentaire ont montré que l'injection rapide de la fraction volatile, préalablement concentrée ou non, d'un produit dans la chambre d'ionisation d'un spectromètre de masse fournit un spectre de masse considéré comme une empreinte caractéristique (Berdagué *et al.*, 1993 ; Marsili, 1999 ; Pérès *et al.*, 2001 ; Pérès *et al.*, 2002a ; Pérès *et al.*, 2002b ; Pérès *et al.*, 2003). Chaque fragment de masse (m/z) de l'empreinte spectrale est considérée comme un capteur, et parfois désigné sous le nom de pseudo capteur (Pilar Marti *et al.*, 2005). Les empreintes spectrales sont utilisées à des fins de caractérisation

et de prédiction de la qualité du produit. A ce jour, le couplage sans étape séparative d'un spectromètre de masse avec des techniques d'extraction telles que l'espace de tête statique, l'espace de tête dynamique ou la microextraction en phase solide, a abouti à des méthodes de caractérisation rapides et économiques. Ces nouveaux systèmes connaissent actuellement un intérêt croissant et tendent à se positionner commercialement sur le marché des capteurs de gaz avec le *Smart Nose* (Marin-Epagnier, Suisse), le *Chemsensor*^R (HP4440A/B, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) ou encore le *MS-Sensor*^R (HKR Sensorsysteme GmbH, München, Allemagne). Ces systèmes se composent généralement d'un module d'extraction / injection des composés volatils, couplé à un spectromètre de masse, *via* une ligne de transfert (Figure 5). Cette technique, ainsi que les techniques d'espace de tête sont exposés ci-dessous.

1.2.2.1 Les modules d'extraction / injection

Les techniques d'espace de tête proprement dites (espace de tête statique ou dynamique) sont tout d'abord présentées, suivies de la microextraction en phase solide. L'emploi de ces techniques n'est pas réservé aux capteurs ioniques, mais puisque ce mémoire est consacré à ce type de nez, le parti a été pris de détailler la génération de l'espace de tête à ce stade de l'exposé. En général, l'espace de tête de l'échantillon est supporté par un gaz vecteur qui est un gaz inerte bien, le plus souvent de He, de N₂ ou de H₂, dont le rôle principal est d'entraîner les composés volatils de l'échantillon vers le détecteur pour leur analyse.

○ Espace de tête statique (SHS)

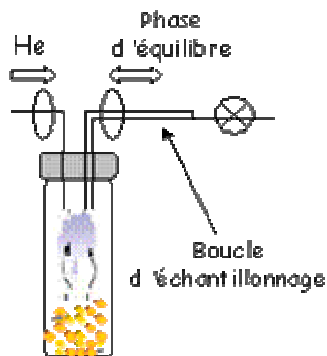
Cette méthode consiste à placer l'échantillon dans un flacon hermétiquement scellé puis, une fois l'équilibre avec la phase gazeuse établi, à prélever les molécules présentes dans l'espace de tête (Figure 6). Souvent utilisée pour l'analyse des produits laitiers (Gallois *et al.*, 1990 ; Pérès *et al.*, 2002a ; Pérès *et al.*, 2003), cette technique présente l'avantage d'une mise en œuvre très simple. En revanche, du fait de l'absence de pré-concentration, la sensibilité de cette méthode peut s'avérer insuffisante pour certaines applications. Parmi les systèmes d'extraction-injection par espace de tête statiques, nous distinguons les systèmes suivants:

- 1- **Prélèvement par seringue** (*systems using gas syringes*) : Un volume donné de l'espace de tête est prélevé puis injecté à l'aide d'une seringue (Schaller *et al.*, 2000).
- 2- **Pressurisation et remplissage d'une boucle d'échantillonnage** (*pressure/loop system*) : Le flacon est pressurisé par rapport à une boucle d'injection au moyen de gaz inerte. La boucle d'injection est ensuite remplie par dépressurisation de l'espace de tête. Enfin, le

balayage de la boucle par le gaz vecteur entraîne les composés volatils dans le spectromètre de masse (Berdaqué *et al.*, 2000).

- 3- **Introduction par membrane** : Les composés volatils désorbés traversent une membrane spécifique par pervaporation puis sont directement transférés dans la chambre d'ionisation par ouverture d'une vanne (Mendes *et al.*, 2000).

Étape d'extraction



Étape d'injection

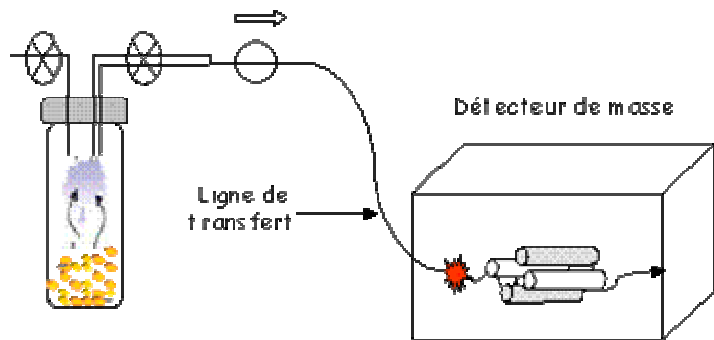


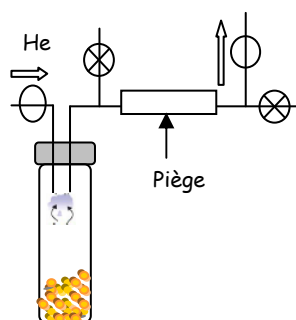
Figure 6. Principe de mise en œuvre de l'espace de tête statique par pressurisation et remplissage d'une boucle d'échantillonnage.

○ "Purge and trap" et espace de tête dynamique (DHS)

Ce sont des techniques classiques de pré-concentration des composés volatils dans des domaines d'applications variés (Pillonel *et al.*, 2002b). Dans ces deux méthodes, les composés volatils sont entraînés sur un adsorbant par un flux de gaz inerte. Les molécules piégées sont ensuite thermiquement désorbées puis injectées dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse (Figure 7). Le "purge and trap" est appliqué à des matrices liquides tandis que l'espace de tête dynamique est appliqué aux matrices solides (Jaillais, 1999).

Grâce à l'étape d'enrichissement du piège (adsorbant) en composés volatils, cette technique autorise l'étude d'analytes peu concentrés. Cependant son utilisation est de mise en œuvre complexe et des précautions doivent être prises pour éviter d'éventuels effets de mémoire, de pertes ou d'adsorptions irréversibles sur le piège.

Etape d'extraction



Etape d'injection

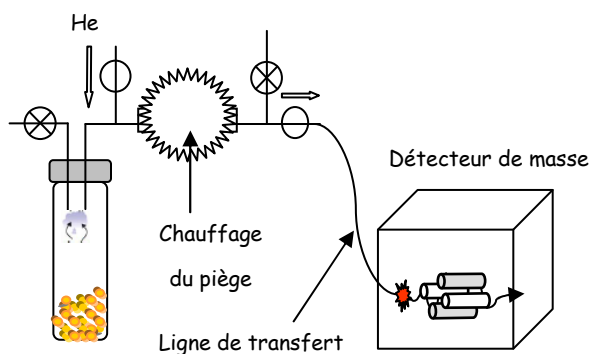


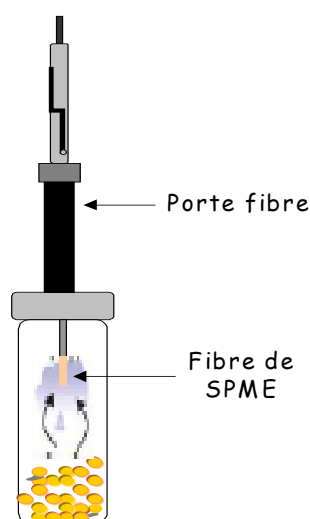
Figure 7. Principe de mise en œuvre de l'espace de tête dynamique.

○ *Microextraction en phase solide (SPME)*

La SPME est une technique développée par SUPELCO (Arthur *et al.*, 1990), elle se caractérise par sa facilité de mise en œuvre. Son principe consiste à exposer une fibre de silice fondue recouverte d'une fine épaisseur d'un composé de type stationnaire (absorbant, adsorbant ou mélange des deux) dans l'échantillon ou son espace de tête. En l'occurrence, pour l'analyse des composés volatils qui nous préoccupe ici, la mise en œuvre du mode par espace de tête est privilégiée (HS-SPME), car celui-ci offre une plus grande sélectivité, en évitant en particulier la contamination ou la saturation de la phase par des composés non volatils de l'échantillon. Les composés volatils vont alors être retenus sur la phase (par absorption ou adsorption selon sa nature) et leur injection dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse s'effectue par désorption thermique (Marsili, 1999 ; de Fatima Alpendurada, 2000 ; Sides *et al.*, 2000 ; Pillonel *et al.*, 2002b) (Figure 8).

Il existe six fibres de SPME commercialisées par SUPELCO et encore sous brevet, chacune d'entre elles pouvant être d'épaisseur différente. Ce sont les fibres polydiméthylsiloxane (PDMS), polyacrylate (PA), carbowax-PDMS, carboxen-PDMS, divinylbenzène-PDMS (DVB-PDMS) et DVB-carboxen-PDMS. Les fibres mixtes telles que le carboxen-PDMS (résultant d'un mélange de carboxen et de PDMS) améliorent les capacités d'adsorption du PDMS, ce dernier étant fortement hydrophobe. La phase de carboxen-PDMS étant un matériau poreux constitué de micro-, méso- et macropores de 6 à 50 Å, elle est recommandée pour l'extraction des molécules très volatiles. Les molécules sont majoritairement adsorbées sur le carboxen-PDMS à la surface de la fibre tandis que, dans le cas du PDMS, la proportion des composés absorbés dans la phase est plus importante.

Étape d'extraction



Étape d'injection

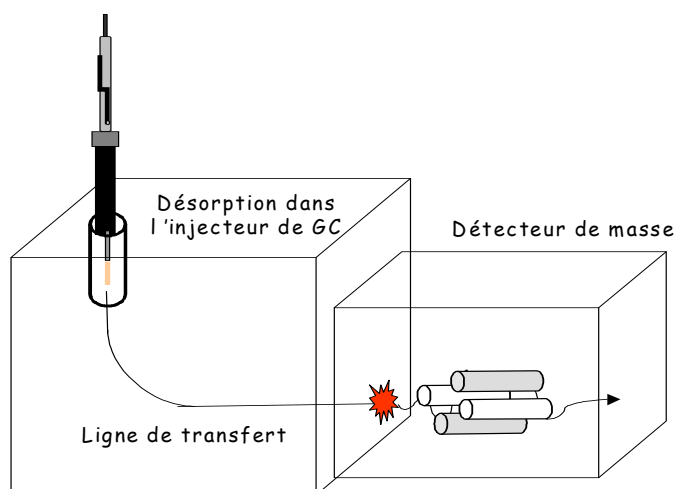


Figure 8. Principe de mise en œuvre de la SPME par espace de tête.

○ *Extraction par sorption (Sorptive Extraction)*

Cette nouvelle technique d'extraction et de pré-concentration a été conçue dans l'optique de pallier les limites de sensibilité de la SPME dues à la faible quantité de phase présente sur la fibre. Cette quantité est de $0,5 \mu\text{L}$ pour une fibre SPME classique alors qu'elle est de 50 à $200 \mu\text{L}$ pour l'extraction par sorption. Ce système d'extraction se présente sous forme d'un barreau aimanté (également appelé *twister*) sur lequel est déposé du polydiméthylsiloxane (PDMS) (Zalacain *et al.*, 2004). Son utilisation est simple : l'extraction consiste à placer le barreau absorbant dans l'échantillon dans son espace de tête. Les molécules ainsi piégées sont ensuite thermiquement désorbées dans l'injecteur chauffé d'un chromatographe en phase gazeuse, puis injectées dans la colonne chromatographique. On parle alors d'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE).

1.2.2.2.2 *La ligne de transfert*

La ligne de transfert assure le couplage entre le système d'extraction / injection et le spectromètre de masse. Elle doit maintenir une perte de charge suffisante pour conserver un vide de bonne qualité dans la source du spectromètre, tout en permettant un acheminement rapide des molécules entre les deux modules. En règle générale, pour ce type d'étude, la longueur de la ligne de transfert ne doit pas excéder 5 m et le diamètre interne est de l'ordre de 0,05 à 0,20 mm.

1.2.2.2.3 *Le spectromètre de masse*

L'ionisation des molécules introduites dans la source du détecteur de masse est principalement obtenue par impact électronique à 70 eV. Cependant une étude portant sur l'influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes spectrales d'un espace de tête statique couplé à un spectromètre de masse (Begnaud *et al.*, 2002) a montré que la qualité du pouvoir discriminant des empreintes spectrales d'échantillons de fromages et de vin, pouvait être améliorée en modifiant le niveau de l'énergie d'ionisation par impact électronique. Cette étude souligne que l'intensité et le pouvoir discriminant des fragments de masse évoluent de façon proportionnelle avec les niveaux des énergies d'ionisation. Malheureusement, le niveau d'énergie pour lequel le rapport signal / bruit est le meilleur dépend de la matrice étudiée. 70 eV reste donc le standard en vigueur dans les nez électroniques.

Les spectromètres de masse généralement utilisés par les techniques de capteurs ioniques sont majoritairement équipés de filtres quadripolaires en raison de leurs faibles coûts et de leurs performances. Seuls Goodner et Rousseff (Goodner *et al.*, 2001) ont exploité le potentiel d'un spectromètre de masse à trappe d'ions dans le domaine de la caractérisation rapide par analyse de l'espace de tête. Leurs travaux présentés sur le jus de pamplemousse ont conduit, non seulement à la caractérisation de plusieurs jus, mais aussi à l'identification des molécules responsables des différences.

La détection des ions est assurée soit par un multiplicateur d'électrons, soit par un multiplicateur de photons, avec des sensibilités comparables. Ce sont les multiplicateurs d'électrons qui sont actuellement les plus répandus en raison de leur prix attractif, mais leur perte de sensibilité au cours du temps constitue leur inconvénient majeur. En revanche, les photomultiplicateurs sont insensibles aux fluctuations de vide du spectromètre de masse ainsi qu'aux risques de contaminations chimiques. Ils présentent une stabilité et une longévité de 10 fois supérieures à celle des électromultiplicateurs. Le choix de la pompe secondaire (à diffusion ou turbomoléculaire) revêt également une importance toute particulière puisqu'une capacité de pompage élevée limite les variations de qualité de vide et la pollution de la source au fil des analyses. Les pompes turbomoléculaires présentent sur ce plan un avantage certain par rapport aux pompes à diffusion (Arpino *et al.*, 1995).

Pour l'élaboration d'une approche « capteurs ioniques », les recherches récentes ont évoqué et élaboré différentes stratégies, dans le but de minimiser au maximum les problèmes de dysfonctionnement de l'appareillage et de limiter les effets d'une dérive potentielle de l'instrument. Celles-ci sont présentées dans le paragraphe suivant.

1.2.2.3 Stratégies de mise en œuvre des capteurs ioniques

Sont abordés ici les différents paramètres à prendre en compte lors de la mise en œuvre des capteurs ioniques, les dérives possibles de l'instrument et les stratégies de traitements de données habituellement associées au nez électroniques.

1.2.2.3.1 *Le choix des conditions opératoires*

Les conditions opératoires doivent être choisies, dans la mesure du possible, afin de ne pas générer à terme de dysfonctionnement ou une pollution trop rapide de l'appareillage. L'utilisation du spectromètre de masse nécessite d'une part le maintien d'une bonne qualité de vide et, d'autre part, de limiter la quantité de matière injectée. L'introduction d'oxygène est également connue pour diminuer la durée de vie du filament. Par ailleurs, la vapeur d'eau injectée peut occasionner des perturbations majeures sur l'ionisation des molécules et engendrer des modifications des spectres de masses par diminution de l'abondance de certains ions et par la formation d'adduits (Canac-Arteaga *et al.*, 1999 a). Enfin, l'introduction de quantités d'eau importantes peut causer une détérioration du détecteur de masse en diminuant à terme sa durée de vie. Une introduction minimale d'eau dans le système est donc un critère de choix important pour l'analyse des produits agroalimentaires. Plusieurs techniques permettant de limiter l'injection d'eau dans le système ont été proposées (Pillonel *et al.*, 2002b) :

- L'incorporation de sels hygroscopiques à l'intérieur de la matrice (Valero *et al.*, 1997).
- Dans le cas du DHS, le balayage (*dry purge*) du piège par un flux d'hélium à température ambiante dans le sens inverse du flux d'extraction (Canac-Arteaga *et al.*, 1999 a).
- L'utilisation d'un piège froid maintenu généralement entre -10 et -15°C , placé entre l'échantillon et la ligne de transfert ou entre l'échantillon et le piège (Canac-Arteaga *et al.*, 1999 b).
- La perméation, qui exploite la diffusion sélective des molécules d'eau à travers la paroi d'un tube spécifique (généralement du Nafion) (Pankow, 1991).

Dans le cadre de ce travail, la matrice étudiée (le liège) contient peu d'eau (environ 4 %). Cette propriété constitue un avantage considérable car cela a permis de s'affranchir de méthodes telles que le *dry purge* ou l'incorporation de sels hygroscopiques, minimisant ainsi les risques de perte totale ou partielle de certaines familles chimiques (notamment les molécules les plus polaires et les plus volatiles) inhérents à l'emploi de telles méthodes.

1.2.2.3.2 Correction des dérives

Plusieurs facteurs peuvent altérer les performances de l'instrument : l'encrassement progressif de la source, les opérations de maintenance (changement de la colonne, nettoyage de la source, etc.) ou encore une qualité du vide affectée par l'introduction simultanée de quantités de matière importantes (Pérès *et al.*, 2003). Ceci peut être à l'origine de dérives du signal. En conséquence, plusieurs procédures de standardisation (interne et externe) des signaux ont été envisagées. La standardisation interne consiste à ajouter dans chaque échantillon une quantité connue d'une ou de plusieurs molécules dont les fragments (choisis comme référence) n'interfèrent pas avec les ions des produits analysés, puis à exprimer l'intensité de chaque fragment de masse par rapport à l'intensité du fragment de masse de l'étalon interne choisi (Marsili, 2000). Cependant, la mise en place de ce type de méthode est préférable pour des échantillons en solution. Dans le cas des produits solides, il est difficile d'envisager cette option sans étape préalable de solubilisation de la matrice. La standardisation externe consiste à redresser les dérives potentielles du signal par rapport à des échantillons ou des gaz de référence analysés dans les mêmes conditions (Pérès *et al.*, 2003).

Pérès *et al.* (Pérès *et al.*, 2003) ont proposé une stratégie consistant à introduire, en continu et indépendamment du gaz vecteur, une faible quantité de xénon dans la source du spectromètre de masse. Chaque fragment de masse de l'empreinte du produit analysé est ensuite normalisé par rapport à l'abondance du xénon mesuré pendant l'analyse. Begnaud *et al.* (Begnaud *et al.*, 2001) ont proposé une autre méthode. Il s'agit d'un algorithme de correction permettant de redresser la dérive mise en évidence lors d'une campagne d'analyses par SHS-MS. Cette méthode a consisté à insérer régulièrement des échantillons de références dans la séquence d'analyse. La variation de la réponse de ces références a ainsi permis de caractériser la dérive. Cependant cette procédure entraîne une augmentation du nombre d'analyses puisque 3 échantillons références étaient nécessaires pour 10 échantillons, ce qui a engendré une augmentation d'environ 30% du nombre d'analyses et, par conséquent une augmentation du coût des analyses.

1.2.2.3.3 Analyse des données

Les empreintes spectrales obtenues par les capteurs ioniques contiennent un grand nombre de fragments de masse (m/z). Les fragments du signal ne répondent pas tous aux besoins d'une étude discriminante. Diverses méthodes statistiques existent et permettent de sélectionner les fragments caractéristiques. Ces méthodes sont globalement classées en deux catégories, les

méthodes dites non supervisées et les méthodes supervisées. Elles sont choisies par rapport aux données.

Idéalement les données présentent une structure exploitable, c'est-à-dire que l'examen direct des empreintes spectrales fait apparaître des variations visibles ; dans ce cas l'application d'une méthode non supervisée telle que l'Analyse en Composantes Principales (ACP) suffit à révéler la variabilité présente dans les données (Marsili, 1999 ; Goodner *et al.*, 2001). Dans d'autres cas, des différences entre les spectres de masses existent mais ne sont pas aussi clairement observables, car plus diffuses. Il convient alors de traiter ces données par des méthodes supervisées telles que l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) et la régression aux moindres carrés partiels (ou *Partial Least Squares* (PLS)) (Marsili, 2000 ; Saevens *et al.*, 2004), ou par les réseaux de neurones (Berdagué *et al.*, 2000). Toutefois, lors de l'utilisation des méthodes supervisées, il est préférable de valider ces modèles en les confrontant à des échantillons « test » qui n'ont pas été utilisés lors de la construction des modèles. Cette étape est nécessaire pour tester la qualité de la classification et la robustesse des modèles employés.

Enfin, il est souhaitable que les fragments sélectionnés par les méthodes statistiques énoncées s'appuient sur une réalité chimique, même s'il est délicat de relier de manière catégorique un fragment de masse d'une empreinte à un composé volatil précis. Il est cependant parfois possible de connaître l'appartenance d'un fragment spécifique à des familles chimiques telles que les acides, les alcools, les cétones, etc. Ainsi, la fragmentation des acides carboxyliques donne un fragment caractéristique à $m/z = 60$ u.m.a., et celle des composés possédant un noyau aromatique donne un fragment caractéristique à $m/z = 78$ u.m.a. La recherche de l'origine chimique des fragments de masse responsables des différences entre les échantillons par capteurs ioniques peut également être parfois facilitée par la mise en œuvre, au préalable, de méthode d'identification et de caractérisation classique des composés volatils telle que la GC-MS. Ainsi, les fragments de masse des composés séparés par analyse chromatographique peuvent être comparés à ceux obtenus dans le cadre d'une analyse rapide.

Quelques exemples récents de mise en œuvre des capteurs ioniques en agroalimentaire sont présentés dans le Tableau 1. Pour chaque exemple sont précisées les techniques d'extraction / injection utilisées ainsi que les méthodes statistiques employées.

Tableau 1. Exemples d'application agroalimentaire des techniques de caractérisation par capteurs ioniques.

Applications agroalimentaires	Type d'appareillage	Durée totale de l'analyse (min)	Analyse des données	Références bibliographiques
Etudes de classification				
◆ Caractérisation de fromage (camembert)	SHD-MS DHS-MS SPME-MS	61,3 7 15	LDA LDA AFD	(Pérès <i>et al.</i> , 2002a) (Pérès <i>et al.</i> , 2002b) (Pérès <i>et al.</i> , 2001)
◆ Caractérisation de l'origine géographique de bouchons de liège œnologique	DHS-MS	27	ACP et PLS	(Boudaoud <i>et al.</i> , 2003)
◆ Caractérisation de jus de fruits selon leur teneur en vanilline	SHS-MS (trappe d'ions)	65	ACP	(Goodner <i>et al.</i> , 2001)
◆ Caractérisation de jus de tomates selon leur arôme	SHD-MS	62	ACP et AFD	(Dittmann <i>et al.</i> , 2000)
◆ Caractérisation de vins selon leurs origines, leurs variétés et leur âge	SHD-MS	65	ACP et SIMCA	(Pilar Marti <i>et al.</i> , 2004)
◆ Caractérisation de fromages (emmental)	SHD-MS SPME-MS PT-MS	13,5 20 25	ACP	(Schaller <i>et al.</i> , 2000)
◆ Caractérisation de tomates selon leur arôme	SPME-MS	12	Analyse canonique	(Berna <i>et al.</i> , 2005)
Etudes de détection de défaut				
◆ Défaut d'odeur du lait	DHS-MS et SPME-MS	14	ACP	(Marsili, 1999)
◆ Date limite de consommation du lait	SPME-MS	14	ACP	(Marsili, 2000)
◆ Suivi de la qualité de pommes selon leur maturité (fermeté)	SHS-MS	22	ACP et PLS	(Saevels <i>et al.</i> , 2004)
◆ Détection rapide de la rancidité dans les chips	SPME-MS	25	AFD	(Vinaixa <i>et al.</i> , 2005)
◆ Détection d'adultération dans les huiles d'olive.	SHD-MS	30	AFD	(Lorenzo <i>et al.</i> , 2002)

SHD espace de tête statique

AFD analyse factorielle discriminante

DHS espace de tête dynamique

ACP analyse en composantes principales

SPME microextraction en phase solide

PLS régression des moindres carrés partiels

PT purge et piègeage

SIMCA modélisation indépendante d'analogie de classe

LDA analyse discriminante linéaire

On peut constater la diversité des applications, ainsi que l'utilisation préférentielle de la microextraction en phase solide (SPME) dans les études de détection de défaut. La plupart de ces applications concernent les produits agroalimentaires de consommation quotidienne. Ces travaux sont généralement dédiés à des tâches de classification basées sur les propriétés des échantillons. Ils suivent les mêmes étapes de présentation où les échantillons utilisés sont spécifiés ainsi que la configuration instrumentale et les méthodes statistiques employées. Le résultat de ces procédés indique la classe d'appartenance des échantillons testés.

Dans ce travail, un espace de tête dynamique couplé à un spectromètre de masse a été mis en place. Selon Pearce et Nitz (Pearce *et al.*, 1998 ; Nitz, 2000), l'injection par espace de tête dynamique est le système qui mime le mieux le système d'aspiration de l'homme, même si ce dernier n'est pas très sensible aux variations de flux ou d'humidité ambiante. Ainsi, les performances d'un DHS-MS ont été testées au travers d'une application particulière, le bouchon de liège, par l'étude de la fraction volatile d'échantillons de liège.

2 Domaine d'application : la filière du bouchon

Il existe actuellement une forte demande de recherche dans le domaine de l'industrie bouchonnière, portant sur la caractérisation, le suivi et le contrôle de la qualité des produits (projet Quercus, Systecode, Codiliège, SAQ). Cette démarche a été initiée, d'une part, par les plus grandes exigences sensorielles des consommateurs et, d'autre part, par la préoccupation des professionnels du secteur viticole soucieux de se préserver de tout ce qui peut altérer la qualité du produit.

L'utilisation du bouchon de liège soulève des problèmes d'ordre technologique. Dans le domaine de l'œnologie, le bouchage est un processus important intervenant dans la conservation du vin. Il est à présent établi que le liège n'est pas totalement neutre vis-à-vis du vin. Le liège, même s'il est sain, peut céder des substances volatiles au vin mis en bouteilles. Ces substances peuvent corrompre l'intégrité olfactive du vin. Le problème majeur spécifique lié à l'utilisation du bouchon de liège est un défaut olfactif connu sous le nom de "goût de bouchon" ou "goût de moisi". Lorsque ce défaut aromatique survient, le vin est fortement déprécié, voire inconsommable. Les altérations de la flaveur du vin, causées par la présence de ce mauvais goût, engendrent de grandes pertes économiques dans l'industrie viticole. Ainsi, 0,5 à 6% de la totalité des bouteilles produites mondialement sont affectées par ce défaut. En France ce pourcentage atteint 3 à 4% des bouteilles (Pereira *et al.*, 2000).

2.1 La démarche qualité dans la filière

Afin de tenter de réduire le pourcentage de non-conformité liée au caractère sensoriel des bouchons, les industriels du bouchon se sont organisés. Ils se sont associés à des partenaires scientifiques afin de mettre en place un groupe de travail. Cette association a permis la rédaction d'une charte de qualité pour l'achat et le contrôle de la qualité du bouchon. L'objectif principal de cette charte est la mise en place d'une démarche qualité à partir d'une procédure minimale des contrôles à effectuer sur les lots de bouchons lors de leur réception.

Les organismes intervenant dans cette démarche qualité sont :

○ **La Fédération Française des Syndicats du Liège (FFSL)** dont la vocation est de promouvoir la profession des bouchonniers-liègeurs. Elle représente l'ensemble de la profession auprès des administrations (réglementation, législation sociale, formation...) et organismes publics ou professionnels de l'embouteillage et du monde vitivinicole. Elle est en

particulier membre fondateur de la Confédération Européenne du Liège (C.E. Liège). La Fédération participe à l'élaboration des Normes Françaises NF, européennes CEN et internationales ISO, concernant le secteur. Plusieurs de ses adhérents sont déjà certifiés ISO 9002 par l'association française de l'assurance qualité (AFAQ).

○ **C. E. Liège**, fondée en 1987, est une organisation constituée de 6 pays membres impliqués dans l'industrie du liège (production, fabrication et distribution). Chaque pays est représenté par sa propre Fédération nationale en France, en Allemagne, en Grande-Bretagne, en Italie, en Espagne et au Portugal. La C. E. Liège travaille en étroite collaboration avec les institutions et les centres de recherches européens impliqués dans l'industrie du liège et du vin. Les principales missions de la C.E. Liège sont la recherche, l'établissement des normes internationales et l'échange d'informations avec d'autres organisations viticoles.

○ **G.I.E Codiliège**: le groupement pour la codification des mesures dans l'utilisation des bouchons de liège, Codiliège, est né de la volonté de plusieurs entreprises bouchonnières françaises de s'unir pour offrir davantage d'informations sur la qualité du liège et de sécurité en matière de bouchage. Leurs objectifs sont d'élaborer des méthodes d'analyses physiques et chimiques pour le contrôle des lots de bouchons. Les membres du G.I.E sont producteurs de bouchons en liège. Il s'agit des neuf entreprises françaises suivantes : Sabaté S.A., Barangé S.A, Groupe Bourrassé, Lafitte liège, Prêteux Bourgeois S.A., Sagraera et Cie., groupe SIBEL S. A, Société Française du liège, et Bouchons Trescases.

Les bouchonniers français se sont dotés de normes particulièrement rigoureuses permettant d'analyser et de caractériser les bouchons. Des programmes de recherches ont été initiés tels que le programme Quercus, mené entre 1994 et 1999, dans le but de mettre en place des méthodologies dans les industries de transformation du liège en bouchon, ainsi qu'une méthodologie de classification sensorielle afin de mieux distinguer les nuances du défaut organoleptique du liège. De ce programme a découlé un "Code international des pratiques bouchonnières" (dernière édition 1998). Ce code établit les règles à suivre pour la production de bouchon en liège pour l'ensemble des utilisateurs de bouchons. La FFSL participe également à la démarche Systecode initiée par la C. E. liège. Systecode est une démarche qualité volontaire des entreprises de la filière du liège (de la forêt à la préparation du liège, la fabrication, la finition et le négoce du bouchon en liège), et ce dans tous les pays européens adhérents à la C. E. Liège. C'est un système d'accréditation dont l'objectif est de vérifier que les sociétés de toute la filière appliquent l'audit des entreprises bouchonnières afin de garantir

l'application du code des pratiques bouchonnières. Le système d'audit est mené par une organisation externe : le bureau Véritas. Cette structure indépendante vérifie si une entreprise remplit les conditions nécessaires à l'accréditation puis délivre le certificat. A ce jour, 26 entreprises françaises (adhérentes à la FFSL) ont reçu l'attestation Systecode pour leur activité bouchonnière.

Après avoir présenté la démarche qualité dans la filière du liège œnologique, et les différents acteurs impliqués dans cette filière en Europe, nous allons nous intéresser au liège en lui-même.

2.2 Le liège

Le liège est formé par l'écorce d'un chêne particulier, le chêne-liège *Quercus suber* qui jouit de la particularité de reconstituer son écorce après enlèvement. Le liège est un tissu végétal composé de cellules mortes hexagonales. Leurs espaces intercellulaires sont remplis d'air, ce qui lui confère une densité extrêmement faible. Les propriétés d'élasticité et d'étanchéité du liège en font un matériau de bouchage remarquable. Ces propriétés ont été exploitées depuis fort longtemps. Des amphores bouchées avec du liège, datant du V^{ème} siècle avant J-C, ont été découvertes dans le bassin méditerranéen, en Grèce, en Italie et en Egypte. C'est dans la deuxième moitié du XVII^{ème} siècle que l'innovation déterminante de l'utilisation du liège comme système de bouchage a eu lieu. Les deux événements qui ont révolutionné les pratiques de commercialisation du vin sont, d'une part, l'utilisation des bouteilles en verre en Europe pour la garde et le transport des liquides, et d'autre part, la découverte du bouchon de liège. Cette découverte a été attribuée à Dom Pérignon (1638-1715), cellérier bénédictin français de l'abbaye de Hautvillers en Champagne, qui, en mettant au point le processus de champagnisation, remplace le système de bouchage de l'époque (bondons de bois enveloppés de feuilles de chanvre huilées) par des morceaux (bouchons) de liège. La légende prétend qu'il eut cette idée en observant les moines de retour de Saint Jacques de Compostelle en Espagne qui utilisaient le liège pour la fermeture de leurs gourdes. Actuellement, le bouchon contribue à la conservation et à la bonification du vin en bouteilles et participe à la qualité du produit. Son rôle principal est d'assurer l'étanchéité de la bouteille en respectant les qualités organoleptiques des produits.

2.2.1 Origine et préparation du liège

L'habitat naturel du chêne-liège est le pourtour du bassin méditerranéen occidental. L'aire naturelle de la subéraie (forêt d'exploitation du chêne-liège) mondiale est d'environ 2 687 000 hectares répartis principalement sur sept pays (

Figure 9). Le Portugal, avec 860 000 hectares, est le premier producteur mondial de liège avec 32% de la superficie mondiale. Le second producteur mondial est l'Espagne avec 27% de la superficie mondiale. Viennent ensuite la Maroc (16 %), l'Algérie (14%), la Tunisie (5,3%), l'Italie (3,7%) et enfin la France (1,6%). (<http://www.institutduliege.com/repartition.php>)

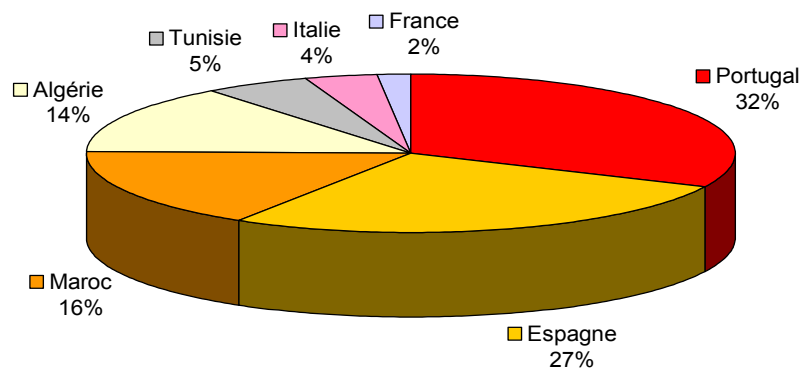


Figure 9. Répartition mondiale des suberaies.

Dans le domaine forestier, l'Union Européenne intervient par divers instruments financiers pour l'essentiel rattachés à la politique agricole, par le soutien d'actions et de gestion forestière, à travers des programmes nationaux et régionaux. A ce titre, les suberaies ont bénéficié de nombreuses mesures, notamment d'entretien, afin d'enrayer la baisse de production et de faire face à une demande mondiale en expansion. Ainsi, concernant la récolte, l'union européenne a édicté des règles afin de protéger les ressources naturelles. Il faut une période nécessaire de 25 ans pour que le premier écorçage ait lieu. Le produit de la première levée donne un liège de qualité médiocre, impropre à la production de bouchons. Celui qui est utilisé pour la fabrication des bouchons est le liège de reproduction, dit liège femelle, obtenu après plusieurs levées de l'arbre. La durée entre deux levées du liège femelle est d'au moins 9 ans. Les lièges de reproduction possèdent une structure cellulaire plus

régulière. La qualité du liège s'améliore de levée en levée. Le liège est destiné à l'industrie du bouchon à partir de la deuxième levée. La production de liège augmente avec l'âge de l'arbre dont la longévité se situe autour de 170 ans.

2.2.2 Cycle de production du bouchon de liège

L'industrie traditionnelle du bouchon a subi plusieurs modifications dans le but d'améliorer l'homogénéité des produits finis et d'augmenter la productivité. Ainsi la production actuelle du bouchon requiert plusieurs étapes de production, représentés sur la figure 10 et détaillés ci-dessous.

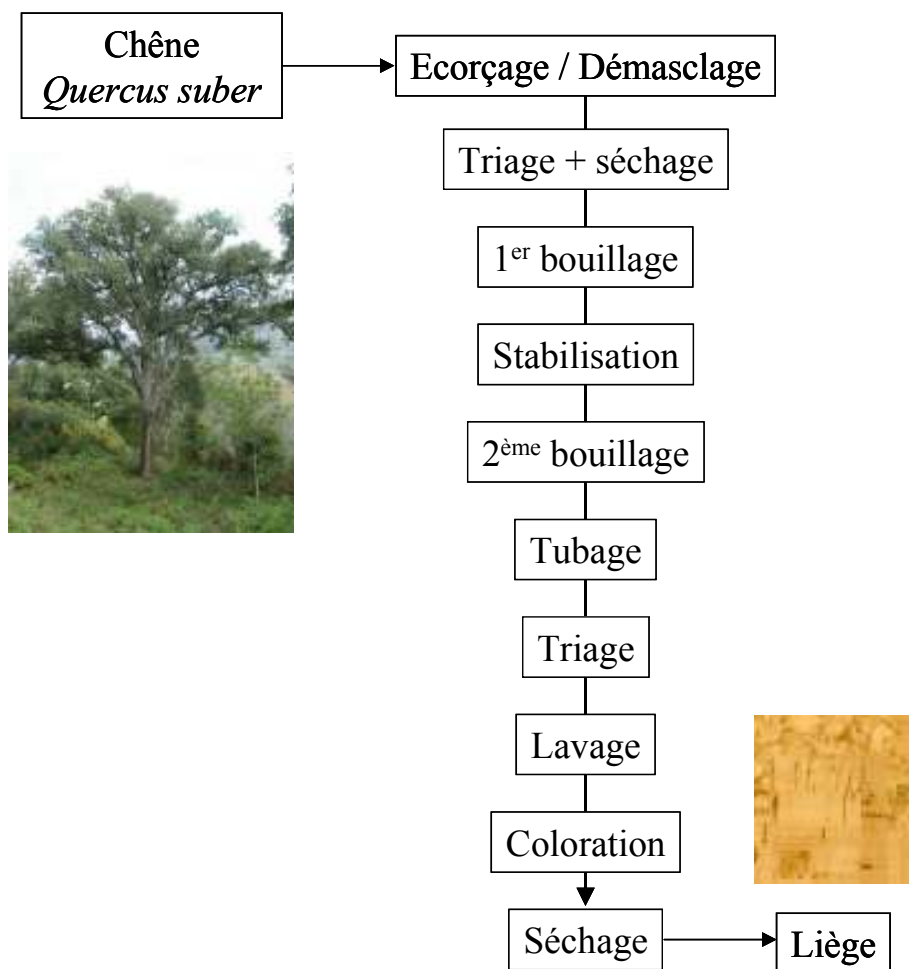


Figure 10 : Le cycle de production du liège œnologique.

○ **Ecorçage ou démasclage** : le cycle d'exploitation du chêne liège commence tout d'abord par l'écorçage. Une première étape de sélection du produit initial est effectuée dans les

subéraies. La levée du liège s'exécute manuellement selon une pratique traditionnelle à l'aide d'une hachette spéciale très tranchante. D'abord deux profondes entailles horizontales sont pratiquées, l'une à la base du tronc et l'autre en haut, puis deux entailles verticales. Les plaques de liège sont enlevées avec le manche de la hachette. Les entailles pratiquées au cours de cette étape doivent être précises, car des lésions dues à une mauvaise manipulation peuvent compromettre la qualité du produit et causer à long terme la mort de l'arbre.

○ **Triage et séchage** : les planches de liège sont empilées à l'air libre pendant 6 à 12 mois afin de permettre au liège de s'affiner par oxydation.

○ **Bouillage** : cette étape s'effectue pendant 45 à 90 minutes dans de l'eau. Ce nettoyage permet d'éliminer une partie des substances hydrosolubles du liège (en particulier les composés phénoliques du liège), d'augmenter son épaisseur, de réduire sa densité et d'améliorer sa souplesse.

○ **Stabilisation** : les plaques sont ensuite stabilisées pendant 2 à 4 semaines dans un lieu où l'aération et l'humidité sont réglables. Cette opération permet aux planches de s'aplanir ; le liège sèche pour atteindre la consistance permettant la découpe.

○ **Sélection du liège et stockage** : le liège subit un tri. Les planches qui ne correspondent pas au calibre et à la qualité souhaitée sont éliminées.

○ **Deuxième bouillage** : le liège commercialisé à l'état de planches est bouilli une seconde fois, pendant environ 30 minutes, pour le rendre malléable.

○ **Tubage** : le liège sélectionné est coupé en bandes d'une longueur équivalente à la hauteur du futur bouchon à l'aide d'un appareil à lame tubulaire.

○ **Triage** : après l'étape de tubage, les bouchons sont généralement triés manuellement. Le tri permet d'éliminer les défauts rédhibitoires (excès de porosité, dimension non conforme, tâches jaunes, galeries d'insectes, etc.) et de classer les bouchons jugés acceptables en 7 qualités allant de 0 à 6 (6 étant la meilleure qualité).

○ **Lavage** : cette étape a pour but de nettoyer et de désinfecter le bouchon. Le procédé traditionnel de lavage au chlore, suivi d'un bain d'acide oxalique, est déconseillé, les résidus de ces produits pouvant être en partie responsables de la présence de chloroanisoles, à l'origine d'altérations organoleptiques du vin. Les industriels utilisent désormais un lavage au peroxyde d'hydrogène ou à l'acide peracétique. Le lavage ne doit pas laisser de résidus peroxydiques supérieurs à 0,2 mg par bouchon, sur produit fini prêt à l'emploi. Les lavages à

l'acide sulfamique ou au métabisulfique sont aussi admis. Ils présentent néanmoins l'inconvénient de ne pas agir sur tous les micro-organismes.

○ **Coloration** : par un souci purement esthétique le liège subit parfois une coloration. Un seul colorant est actuellement autorisé. Il s'agit d'un produit de synthèse, le jaune orangé S (E110, selon le code CEE).

○ **Séchage** : il s'effectue au four, au soleil ou en chambre ventilée à hygrométrie contrôlée, et doit aboutir à une humidité finale des bouchons comprise entre 4 et 8%.

Les différentes étapes de production du liège ayant été décrites, il convient maintenant de s'intéresser à la nature même du liège ainsi obtenu.

2.2.3 Le liège

Dans ce chapitre seront présentés tout d'abord les composants principaux du liège, puis les défauts possibles du liège produit, tels que des défauts physiques et des défauts organoleptiques. Ces défauts sont en effet gênants, soit pour la production de bouchons à partir de ce liège œnologique, soit pour la préservation de la qualité du vin.

2.2.3.1 La constitution chimique du liège

Le liège du chêne *Quercus suber* est une substance très complexe. L'étude de sa composition chimique a été menée au cours de nombreux travaux qui ont conduit à des résultats parfois contradictoires. La plupart des constituants du liège ne sont accessibles qu'après dépolymérisation et les résultats sont fortement liés aux procédés utilisés. Les constituants du liège sont présents à des proportions qui varient selon l'âge et l'habitat du chêne liège. Il est cependant admis que le liège est notamment constitué d'environ 40% de subérine, 22% de lignine, 20% de polysaccharides et de 18% de composés divers parmi lesquels les cires, la matière minérale et l'eau (Lopes *et al.*, 2001).

- **La subérine** : la subérine est le constituant principal du liège de *Quercus Suber* ; c'est une substance originale très complexe, sorte de polymère lipidique. La structure macromoléculaire de la subérine n'est pas encore établie de façon définitive puisque son extraction ne peut se faire qu'après dépolymérisation par des méthodes d'hydrolyses alcalines (Cordeiro *et al.*, 1998 ; Rocha *et al.*, 2001). Les unités monomériques ainsi obtenues sont identifiées par GC-MS. Plus récemment, des méthodes de clivage par transméthylation suivie d'une pyrolyse/GC-MS ont été employées (Bento *et al.*, 2001) et ont permis l'identification de

fractions de subérine constituées d'une fraction aliphatique et d'une fraction phénolique. La fraction aliphatique de la subérine est constituée d'acides ω -hydroxylés, d'acides α - ω -dicarboxyliques, de longues chaînes d'acides gras et de longues chaînes d'alcools (Rocha *et al.*, 2001). La partie phénolique reste un sujet de débat. Il a cependant été récemment suggéré que celle-ci était principalement constituée de polymères de gâñacyl (Rocha *et al.*, 2001).

- **La lignine** : la lignine est un produit de masse moléculaire élevée, résultat du couplage de polymères polyphénoliques distribués de façon aléatoire. Les trois unités monomères de la lignine sont l'alcool coniférylique, l'alcool para-hydroxycinnamique et l'alcool sinapylique (Riboulet *et al.*, 1986).

- **La cellulose et les polysaccharides** : la cellulose résulte de la condensation exclusivement linéaire d'unités glucose unies entre elles par des liaisons β (1-4) (Riboulet *et al.*, 1986).

- **Les matières extractibles** : la friedline est le constituant majeur obtenu après extraction du liège au dichlorométhane. Cette molécule fait partie de la famille des oxytriterpènes de formule brute $C_{30}H_{50}O_2$. La bétuline ainsi que plusieurs acides gras : arachidique, cérotique, oxyarachidique, oléique et linoléique (Riboulet *et al.*, 1986 ; Castola *et al.*, 2002), sont présents dans les extraits. Quelques stéroïdes ont également été identifiés tels que le β -sistostérol et le campéstérol (Castola *et al.*, 2002).

2.2.3.2 Les défauts physiques des bouchons de liège

Le tissu subéreux du liège présente une structure de discontinuité : la lenticelle. C'est sur le nombre et la taille de ces lenticelles que se base la classification visuelle commerciale des plaques de liège et des bouchons. Les anomalies considérées comme des défauts sont celles qui portent atteinte à l'homogénéité du tissu subéreux et à ses caractéristiques physiques et mécaniques, entraînant à terme un défaut d'étanchéité du bouchage. Les critères de conformité établissent des exigences de qualité pour la couleur, l'aspect visuel en liaison avec la présence ou l'absence de tâches jaunes, de crevasse, de galerie d'insectes, de liège soufflé, de liège vert, etc. D'autres critères physiques sont également considérés tels que la dimension des bouchons, la force d'extraction employée pour déboucher les bouteilles, l'étanchéité aux liquides et le taux d'humidité des bouchons (Vigne et Vin publications internationales (Bordeaux, 2002)).

2.2.3.3 Les défauts organoleptiques du bouchon

Les opérations du contrôle de suivi de la qualité du bouchon mettent en évidence une importante proportion de vins qualifiés de « bouchonnés » ou de « moisiss » parmi les

échantillons non conformes. D'après les résultats d'un projet baptisé Quercus et mené en 1996, 0,5 à 7% des vins analysés présentaient ce défaut. Cela engendre des pertes économiques considérables dans la filière vitivinicole mondiale, estimées à 10 milliards de dollars par an (Fuller, 1995 ; Pereira *et al.*, 2000).

La problématique du « goût de bouchon » est complexe car ce terme peut englober plusieurs odeurs aux nuances différentes de moisi, terreux, champignon et brûlé. Chacune de ces nuances peut provenir de sources de contaminations variées (Rapp, 1993). Plusieurs études ont été menées afin de caractériser et d'identifier les volatils indésirables responsables des mauvais goûts dans le vin causés par le bouchon en liège. Certaines études remontent au début du XX^{ème} (Bordas, 1904). Les microorganismes utilisant le liège comme substrat sont très souvent mis en cause dans certains cas de « goût de bouchon » à nuance **moisi, croupi ou terreux**. De nombreux microorganismes se trouvent seuls ou en cortège, à la surface des bouchons comme en profondeur, dans les zones lenticellaires ou en dehors des espaces lenticellaires (Riboulet *et al.*, 1986). La contamination débute sur l'arbre. Il y a ensuite implantation d'une flore secondaire, d'abord lors du stockage des planches de liège et des bouchons, puis sur les bouteilles lors du séjour en cave. Cette flore n'est donc pas limitée ou uniforme, elle évolue au cours du temps. Une succession de souches d'origines différentes se développe selon le substrat liège, l'hygrométrie et la température ambiante. Leur présence sur le liège est depuis longtemps démontrée. La microflore du liège est surtout constituée de moisissures dont l'équipement enzymatique est capable de métaboliser les différents constituants du liège et de produire des molécules volatiles qui peuvent jouer un rôle en agissant seules ou en interagissant avec des composants du vin. La présence des microorganismes sur le liège n'entraîne pas obligatoirement l'apparition de mauvais goûts. Néanmoins, la microflore du bouchon est un facteur de risque d'apparition de mauvais goûts.

Dès 1900, Mathieu (Mathieu, 1900) distingue plusieurs goûts de bouchon, notamment des goûts de moisi et de pourri, sur les vins en bouteille. Il isole par ailleurs plusieurs souches de champignons, en particulier *Penicillium*. Bordas en 1904 isole les champignons *Aspergillus niger* et *Penicillium glaucum* d'échantillons de liège atteint de tâche jaune et tente d'établir une relation entre la tâche jaune et le goût de bouchon (Bordas, 1904). Des travaux plus récents contribuent à mieux connaître cette flore. En 2003, Alvarez-Rodriguez et al. (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003) étudient l'évolution de la population microbienne au cours du processus de fabrication de bouchons en liège aggloméré. 55 microorganismes ont été isolés : 8 levures, 14 champignons filamenteux, 13 actinomycètes et 20 bactéries non filamenteuses.

2.2.3.4 Les molécules volatiles impliquées dans les mauvais goûts

Les molécules volatiles impliquées dans les mauvais goûts du vin causés par le bouchon appartiennent à diverses familles chimiques telles que les alcools et cétones (oct-1-èn-3-ol et oct-1-èn-3-one), les terpènes (méthyl-isobornéol et géosmine), les pyrazines (2-méthylthio-3-éthylpyrazine), les phénols (gaïacol) et enfin les anisoles (2,4,6-trichloroanisole et le 2,3,4,6-tétrachloroanisole). Les mauvais goûts imputés à ces molécules sont détaillés ci-dessous, et rassemblés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les principales molécules impliquées dans les mauvais goûts.

Familles chimiques	Molécules	Mauvais goûts	Références bibliographiques
Alcools	Oct-1-èn-3-ol	Champignon	(Chatonnet <i>et al.</i> , 1994) (Kaminski <i>et al.</i> , 1974)
Cétones	Oct-1-èn-3-one	Champignon	(Chatonnet <i>et al.</i> , 1994) (Kaminski <i>et al.</i> , 1974)
Composés terpéniques	Méthyl-isobornéol	Terreux, Champignon	(Vivas <i>et al.</i> , 1997)
	Géosmine	Poussiéreux Terreux	(Chatonnet <i>et al.</i> , 1994)
Pyrazines	2-Méthylthio-3-pyrazine	Moisi Sulfuré	(Rapp, 1993)
Phénols	Gaïacol	Fumée Médicament	(Rapp, 1993)
Chloroanisoles	2,4,6,-Trichloroanisole 2,3,4,6- Tétracholoroanisole Pentachloroanisole	Moisi	(Chatonnet <i>et al.</i> , 1994) (Rapp, 1993)

• **L'octen-1-ol-3 et l'octen-1-one-3** : selon Chatonnet (Chatonnet *et al.*, 1994) et Kaminski (Kaminski *et al.*, 1974), les alcools et les cétones insaturés ont été parfois identifiés comme responsables d'odeurs et de goût champignonnés. Ces molécules seraient produites par des moisissures : *Aspergillus* dont *A. niger*, *Penicillium* dont *P. roqueforti*.

- Le **méthyl-isobornéol** (1,2,7,7-tétraméthylbicyclo[2,2,1] heptan-2-ol) a été signalé dans les vins dits "bouchonnés" (Amon *et al.*, 1989). On peut également retrouver cette molécule dans l'eau et dans de nombreux produits marins (Gerber, 1972 ; Chatonnet *et al.*, 1994) contaminés par certaines algues (cyanobactéries). Son seuil de perception est de 30 ng/L dans l'eau.
- La **géosmine** (trans 1,10-diméthyl-trans-9-décalol) est un composé qui ne possède pas à proprement dit un goût de "moisi" mais plutôt un caractère "poussiéreux" et "terreux". Cette molécule peut-être synthétisée par des actinomycètes (*Streptomyces*) ou des algues (cyanobactéries). Son seuil de perception est de 10 ng/L dans l'eau (Gerber, 1972 ; Chatonnet *et al.*, 1994).
- Le **gaïacol** : selon Maga 1978 (Maga, 1978), le gaïacol peut provoquer un mauvais goût par interaction avec certains constituants du vin. Sa présence peut être due à la dégradation de la lignine par les microorganismes saprophytes. Plus récemment, le gaïacol a été identifié comme un métabolite intermédiaire de la dégradation de l'acide vanillique, via le catéchol (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003). La dégradation de l'acide vanillique en gaïacol a été détectée chez *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, et chez certaines souches de *Streptomyces* (*Streptomyces. sp. A3*, *Streptomyces sp. A5* et *Streptomyces sp. A13*).
- La **2-méthylthio-3-éthylpyrazine**: pour éviter la prolifération des microorganismes utilisant le liège comme substrat, il est fortement conseillé d'employer des bouchons conditionnés sous SO₂ dans des poches de polyéthylène. Tout autre conditionnement implique un stockage obligatoire dans un local à température de 15 à 20 °C à faible humidité (Riboulet *et al.*, 1986). Cependant, certains auteurs incriminent l'usage du SO₂ (Riboulet *et al.*, 1986 ; Rapp, 1993 ; Chatonnet *et al.*, 1994). L'excès de SO₂ peut donner dans certaines conditions du H₂S. Ainsi, des pyrazines inodores formées dans le liège sous l'action de moisissures, peuvent se combiner au H₂S pour former des composés tels que la **2-méthylthio-3-éthylpyrazine** possédant une forte odeur de "moisi" et sulfuré.

Par ailleurs, une dégradation de la paraffine utilisée comme traitement de surface des bouchons est possible par trois moisissures. La dégradation des silicones, des colles et colorants du bouchon seraient également possible (Riboulet *et al.*, 1986). Cependant, cette piste de recherche, à la lumière des documents consultés, n'a pas encore été explorée.

- Les **chloroanisoles**. Le 2,4,6-trichloroanisole (TCA) est considéré comme la plus importante cause du goût de bouchon (Riboulet *et al.*, 1986 ; Pereira *et al.*, 2000) à odeurs "moisies" intenses dans le liège, les vins, le cognac (Cantagrel *et al.*, 1989) et dans beaucoup

d'autres produits alimentaires notamment la viande de poulet, les fruits secs et le café (Pereira *et al.*, 2000). Le TCA et, dans une moindre mesure, le 2,3,4,6-tétrachloroanisole (TeCA) et le pentachloroanisole (PCA), sont responsables de 80% des cas de goût de moisi dans les vins bouchonnés (Pereira *et al.*, 2000 ; Zalacain *et al.*, 2004). Ces composés ont des faibles seuils de perception, de l'ordre de 5 à 10 ng/L pour le TCA, et 14 à 25 ng/L pour le PCA (Chatonnet *et al.*, 1994 ; Zalacain *et al.*, 2004). Tanner (Tanner *et al.*, 1981) identifie par GC-MS et olfactométrie, le **2,4,6-trichloroanisole** dans le vin bouchonné et dans certains bouchons de ces vins. Buser (Buser *et al.*, 1982) a détecté la présence du 2,4,6-TCA dans les bouchons en liège et a suggéré que le TCA détecté serait probablement le résultat de la chloration des produits de dégradation de la lignine durant le traitement de blanchiment au chlore des bouchons. Chatonnet (Chatonnet *et al.*, 1994) a confirmé les travaux de Tanner et de Buser en corrélant l'odeur la plus intense dans les vins dits bouchonnés à la présence de TCA et de tétrachloroanisole. De nombreux travaux ont cherché à élucider la formation des chloroanisoles à partir des constituants du liège ou de son environnement, soit dans la filière bouchon, soit dans la filière vin. Les chloroanisoles proviendraient de la biométhylation des chlorophénols correspondants. Cette réaction peut être effectuée par un grand nombre de microorganismes, par exemple les moisissures. Elle semble offrir une explication plausible à l'apparition sporadique du défaut de moisi dû au TCA dans les bouchons. Les chlorophénols eux-mêmes sont des molécules peu odorantes. Elles ont été largement employées dans le passé comme insecticides pour le traitement des bois mais peuvent également avoir d'autres origines (Riboulet *et al.*, 1986). Le chlore entre dans la composition de nombreux agents de nettoyage préconisés en œnologie. Cet élément, sous forme de dichlore gazeux Cl₂, d'acide hypochloreux ClOH ou d'ions hypochlorites ClO⁻ selon le pH et la température, peut agir avec les phénols pour former des chlorophénols par une réaction de substitution électrophile (Chatonnet *et al.*, 1994) ; le chlore réduit sous forme d'ion chlorure Cl⁻ est en revanche inactif. D'autres origines du TCA peuvent être envisagées. Les travaux de Maujean (Maujean *et al.*, 1985) ont montré que certaines moisissures du genre *Penicillium* étaient capables de synthétiser le noyau phénolique en utilisant la voie des pentoses. Le noyau phénolique, par chloration, évolue en 2,4,6-trichlorophénol. Le chlorophénol peut à son tour être transformé en 2,4,6-TCA par ces mêmes microorganismes.

Dubois (Dubois, 1994) extrait, non pas dans les vins mais dans l'atmosphère des caves, le **2,3,4,6-tétrachloroanisole** et, en quantité nettement supérieure, le **pentachloroanisole**. Il affirme que c'est le TeCA qui possède l'odeur caractéristique de certaines caves. Ces

chloroanisoles seraient produits par méthylation des chlorophénols (pentachlorophénols) utilisés dans les produits de traitement de bois et largement employés comme fongicides, insecticides, biocides et herbicides.

L'authentique « **goût de bouchon** » ou « puant » est très rare. Il transmet au vin une odeur putride et butyrique qui le rend écœurant. Son origine est liée au liège mais sa cause est encore à l'heure actuelle méconnue (Pereira *et al.*, 2000). Les bouchons présentant des «tâches jaunes» sont supposés provoquer ce goût. Ceci est vrai dans certains cas mais la relation entre la tâche jaune et le goût de bouchon n'est pas systématique. Certains auteurs (Riboulet *et al.*, 1986) rattachent ce goût de puant à l'attaque du liège par un champignon parasite des végétaux, au pied de l'arbre : l'*Armillaria mellea*. On évite à présent d'extraire le liège à partir de la base de l'arbre.

2.2.4 Approches classiques pour l'analyse des composés volatils du bouchon de liège

Les méthodes classiquement employées pour l'évaluation de la qualité organoleptique des bouchons sont l'analyse sensorielle et l'analyse chromatographie en phase gazeuse.

2.2.4.1 L'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle du liège peut être réalisée suivant des méthodologies diverses : trempage des bouchons dans l'eau et/ou dans le produit à boucher, ou encore par brûlage du liège. Ces tests permettent la mise en évidence de différents "mauvais goûts" (liégeux, terreux, moisi, etc.). Les dégustateurs doivent être sensibilisés à la détection des défauts olfactifs pour réaliser correctement cet essai. Le jury d'expert est formé selon les spécifications ISO et AFNOR (Vigne et Vin publications internationales (Bordeaux, 2002)). Cette formation permet de tester la sensibilité, la reproductibilité, la répétabilité des dégustateurs et d'harmoniser les critères d'acceptation ou de rejet afin d'éviter le refus anarchique ou injustifié des lots. La présence d'un défaut olfactif ou gustatif est réductrice, car elle entraîne le rejet de tout le lot.

2.2.4.2 La chromatographie en phase gazeuse

Pour répondre aux problèmes olfactifs causés par des accidents de fabrication du bouchon (goût de bouchon), la méthode chimique d'évaluation de la qualité olfactive du bouchon la plus communément mise en œuvre est la chromatographie en phase gazeuse couplée à

différents modes de détection tels que le détecteur à capture d'électrons (ECD) (Juanola *et al.*, 2004) ou le spectromètre de masse (MS) (Caldentey *et al.*, 1998). Les méthodes d'analyse chimiques sont essentiellement dédiées à l'identification et au dosage des chloroanisoles, en particulier le TCA. Les étalons les plus communément employés pour l'étude qualitative et quantitative du TCA en GC-ECD sont le lindane (Juanola *et al.*, 2004), le dibromo-1,2-benzène (Cantagrel *et al.*, 1989), le diméthyl-3,4-phénol (Cantagrel *et al.*, 1989) et le *n*-pentadécane (Chatonnet *et al.*, 1994). Concernant les analyses en GC-MS, c'est le TCA polydeutééré (D₅-TCA) qui est le plus souvent employé (Evans *et al.*, 1997). Préalablement à l'analyse chromatographique, des étapes d'extraction et de concentration des extraits sont nécessaires. Les méthodes classiques d'extraction appliquées au dosage du TCA font généralement appel à des méthodes d'extraction par solvants telles que :

- La macération du liège pulvérisé dans du pentane pendant quinze jours, suivie d'une distillation avant concentration (Rigaud *et al.*, 1984), ou dans de l'hexane pendant 12 heures sans concentration (Bertrand *et al.*, 1994).
- La macération hydroalcoolique suivie d'une extraction liquide-liquide par le pentane (Rocha *et al.*, 1996).
- La macération hydroalcoolique suivie d'une extraction en phase solide sur une cartouche remplie de silice greffée C18, suivie elle-même d'une reconcentration de l'extrait avant injection en GC (Soleas *et al.*, 2002).
- L'extraction solide-liquide par Soxhlet (Chatonnet *et al.*, 1994).
- L'extraction par sonication de liège pulvérisé dans du pentane (Juanola *et al.*, 2002).
- L'extraction par solvant (pentane) sous agitation mécanique (*shake flask extraction*) (Juanola *et al.*, 2002).
- L'extraction par fluide supercritique (SFE) couplée à la GC-MS en mode de sélection des ions (*Selected Ion Monitoring* (SIM)) (Marisa *et al.*, 2000). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, sélective et ne requiert pas de grands volumes de solvants.

Juanola *et al.* (2002) ont confronté les performances de 3 méthodes d'extraction des volatils du liège : agitation mécanique, Soxhlet et sonication dans du pentane. La méthode d'extraction la moins efficace était la méthode par sonication.

D'autres méthodes d'extraction plus récentes ont été employées telles que :

○ La désorption thermique couplée à un espace de tête dynamique conduite sur matrice solide (liège réduit en poudre) suivie d'une analyse en GC-MS (Caldentey *et al.*, 1998).

○ La microextraction en phase solide suivie d'une GC-MS (Evans *et al.*, 1997). La SPME est effectuée sur une solution de macération hydroalcoolique du liège réduit en poudre ou non (Juanola *et al.*, 2004).

L'avantage de ces techniques d'extraction par espace de tête est leur moindre consommation de solvant, leur rapidité et leur facilité de mise en œuvre.

Concernant le choix de la nature de la fibre SPME à employer pour l'extraction du TCA à partir de solutions modèles de vin, Riu (Riu *et al.*, 2002) a étudié les performances de cinq types de phases. Les fibres recouvertes des phases suivantes ont été testées : polydiméthylsiloxane (PDMS) 100 µm, PDMS-divinylbenzene (DVB) 65 µm, polyacrylate (PA) 85 µm, Carboxen (CAR)-PDMS 75 µm et enfin la StableFlex DVB-CAR-PDMS 50/30 µm. Les résultats traités en terme de répétabilité et de sensibilité de l'analyse par SPME/GC-ECD, ont montré que la fibre de PDMS permettait d'obtenir la meilleure répétabilité tandis que la meilleure sensibilité était obtenue par la fibre de DVB-CAR-PDMS.

Peu de travaux consacrés à la migration du TCA dans le vin ont été publiés. Le *Cork Quality Council* diffuse les résultats d'une étude menée par ETS Laboratories (Santa Helena, Californie, USA). Une telle approche nécessite la mise en œuvre de méthodes quantitatives fiables (SPME/GC-ECD ou SPME/GC-MS et analyse sensorielle) et leur application sur le vin et le bouchon ayant servi à l'obturer. La mise en relation des résultats de ces deux méthodes permet de mieux appréhender les questions du seuil de déviation olfactive et les questions relatives à la migration du TCA dans le vin. Dans ce contexte, Juanola (Juanola *et al.*, 2004) a analysé quatre types de bouchon ayant servi à boucher du vin blanc pendant une période de 8 mois. Les analyses GC des bouchons ont été menées sur des extractions effectuées avec du pentane pour la mesure du TCA dit total. L'analyse sensorielle s'est effectuée par trempage des bouchons dans une solution aqueuse pour la mesure du TCA dit extractible. L'analyse sensorielle du vin a été suivie par une SPME/GC-ECD. Les résultats montrent une bonne corrélation entre les analyses sensorielles du vin et les résultats SPME/GC-ECD de ces mêmes vins. En revanche, la faible corrélation obtenue entre le TCA total quantifié par GC-ECD et l'analyse sensorielle des bouchons trempés dans l'eau, montre que seule une petite fraction du TCA total est extraite. Le TCA extractible ne dépend pas

seulement du TCA total contenu dans le bouchon, mais également d'autres facteurs tels que sa répartition ou sa localisation dans le bouchon, la surface mise en contact avec la solution d'extraction, le pourcentage d'éthanol de la solution et la nature des microorganismes utilisant le liège comme substrat. ETS Laboratories arrive au même type de résultats par SPME/GC-MS.

2.2.4.3 Nez électroniques

Seules deux études de caractérisation rapides de la fraction volatile du liège ont été conduites par nez électroniques. La première a employé un espace de tête statique couplé à un capteur de gaz constitué de 32 capteurs de type polymères conducteurs (Rocha *et al.*, 1998). La méthode statistique employée était la méthode des réseaux neuronaux. L'objectif de cette étude était le contrôle de la qualité de la fraction volatile du liège au cours du processus de fabrication du bouchon. Les échantillons analysés étaient classés en cinq groupes dont un groupe d'échantillons témoins et un groupe d'échantillons présentant une odeur de liège bouilli considérée comme étant une odeur agréable. Les trois groupes d'échantillons restants présentaient des défauts olfactifs de type terreux, moisi et moisi très intense. L'objectif de cette étude était de caractériser les échantillons témoins et les échantillons de liège bouilli par rapport à ceux présentant des mauvaises odeurs. Cette étude a montré que cette caractérisation était possible par la sélection d'un sous ensemble de 17 capteurs de gaz considérés comme étant les plus discriminants.

La seconde étude a employé un nez électronique à capteur ionique constitué d'un espace de tête dynamique couplé à un spectromètre de masse avec une détection en mode SIM. Cette technique a été développée par Nitz en 1997 et breveté sous le nom de MS-sensor[®]. L'analyse en Composante Principale a été utilisée pour le traitement des données de l'étude. L'objectif de l'étude était de différencier deux groupes d'échantillons de liège : l'un composé de liège sain et le second groupe composé de liège sentant le moisi. Dans cette étude, le capteur ionique a permis de classer correctement deux groupes d'échantillons de liège (Nitz, 2000).

2.3 CONCLUSION

Dans cette première partie, nous avons vu que les techniques d'espace de tête – spectrométrie de masse constituent une nouvelle méthode présentant une alternative intéressante aux méthodes classiques employées pour la caractérisation des molécules volatiles provenant de matrices agroalimentaires. Ces systèmes permettent d'obtenir en quelques minutes

l'empreinte spectrale caractéristique d'un échantillon à partir de sa fraction volatile. L'emploi de ces techniques tient également compte des spécificités des matrices étudiées (liquide et solides). Dans l'optique d'appliquer ce type d'approche dans le domaine de l'œnologie, en particulier dans la filière du bouchon, ce chapitre a également présenté l'organisation de cette filière. Une revue des méthodologies analytiques classiques employées à l'analyse des bouchons a également été proposée. Cette étude bibliographique a montré que le nez électronique à capteurs ioniques mettant en oeuvre un espace de tête statique couplé à un spectromètre de masse a déjà été employé à l'analyse de bouchons de liège présentant un défaut de moisi. Cependant, cette étude a été menée avec une méthode d'extraction sans pré concentration des volatils et sur seulement deux groupes d'échantillon.

Dans notre étude, nous explorons le potentiel de deux autres types de capteurs ioniques à la reconnaissance des volatils du liège. Nous proposons donc de conduire un travail expérimental avec deux objectifs : mettre au point et évaluer deux types de nez électronique à capteurs ioniques, le système DHS-MS et le couplage SPME-MS. Par cela, nous espérons apporter d'autres possibilités à la méthode proposée par Nitz (Nitz, 2000) grâce à l'emploi, cette fois, de méthode d'extraction avec pré concentration des volatils du liège, sur un plus grand nombre d'échantillons et dans une application différente (rondelles miroirs et planches de liège brutes). L'étude de ces deux techniques est donc présentée successivement dans les deux chapitres qui suivent.

3 Nez électronique à capteurs ioniques basé sur une extraction par espace de tête dynamique

Cette partie expose tous les travaux concernant la mise en œuvre et l'application d'un couplage espace de tête dynamique - spectromètre de masse (DHS-MS). Le système DHS-MS employé, un prototype de laboratoire, a nécessité une étape préliminaire de mise au point. Il a ensuite été appliqué à l'analyse de différents échantillons de liège œnologique, en vue de les discriminer selon leur origine géographique ou selon leur qualité. Avant d'aborder les résultats obtenus et de les discuter, nous allons dans un premier temps décrire les matériels et méthodes utilisés dans cette étude.

3.1 Matériels et méthodes

Dans cette partie les échantillons étudiés sont tout d'abord présentés, ainsi que le prétraitement qu'ils ont subi. Les appareillages utilisés sont ensuite exposés. Enfin, les méthodes statistiques mises en œuvre pour exploiter les données obtenues sont explicitées.

3.1.1 Origine et préparation des échantillons

Les échantillons analysés dans l'étude préliminaire de mise au point du capteur ionique sont distincts de ceux pris en compte dans l'étude du pouvoir discriminant du couplage DHS-MS, comme indiqué ci-dessous.

3.1.1.1 Échantillons pour l'étude préliminaire de mise au point du couplage DHS-MS

Les échantillons considérés pour cette étude sont des rondelles de liège champenois dits « miroirs » d'origine espagnole fournie par la société SIBEL (Cumière, France). Les rondelles de liège miroirs représentent la partie inférieure du bouchon de champagne, constituée de 1, 2 ou plus rarement 3 rondelles de liège naturelles en contact avec le vin alors que la partie supérieure est composée de liège aggloméré.

La préparation des échantillons s'est conduite comme suit : un lot de 50 rondelles de liège test a été pulvérisé manuellement puis homogénéisé. Le broyat de liège est ensuite stocké dans un sac de polyéthylène placé à l'obscurité et à température ambiante. Une portion (0,150 g) est pesée puis enveloppée dans du papier aluminium. Avant chaque analyse, l'échantillon de liège est introduit dans le tube d'échantillonnage en acier inoxydable, puis placé à l'intérieur du four de désorption thermique de l'espace de tête dynamique.

3.1.1.2 Echantillons pour l'étude du pouvoir discriminant du DHS-MS

Le tandem DHS-MS a été appliqué à la râpures rondelles de liège miroirs afin d'établir des "modèles" selon les origines géographiques et leur qualité. Les échantillons ont donc été choisis en fonction du type de caractérisation envisagé, comme indiqué ci-dessous.

3.1.1.2.1 Echantillons pour la caractérisation de l'origine géographique

Les échantillons de liège sont des rondelles de liège œnologique qui ont été fournies par SIBEL. Les échantillons proviennent des trois régions géographiques suivantes : Espagne, Portugal et Maroc (Tableau 3). Les lots d'échantillons ont été préalablement étiquetés comme suit : "P1" et "P2" correspondent aux échantillons provenant de deux régions du Portugal, "E1" et "E2" correspondent aux échantillons provenant de deux régions d'Espagne et "M" correspondent aux échantillons provenant du Maroc. Le nombre de répétitions effectuées sur chaque échantillon est variable, selon la quantité reçue pour chacun d'eux.

Tableau 3. Origine des échantillons pour la caractérisation de l'origine géographique, et nombre de répétition des analyses.

Origine des échantillons d'étalonnage	Nombre de répétitions
Portugal lot 1 (P1)	10
Portugal lot 2 (P2)	9
Espagne lot 1 (E 1)	8
Espagne lot 2 (E 2)	10
Maroc (M)	14
Origine des échantillons de validation	Nombre de répétitions
Portugal	13
Espagne	10
Maroc	8

3.1.1.2.2 Echantillons pour la caractérisation de la qualité des bouchons

Les rondelles de liège moisies ont été fournies par le même producteur Champenois SIBEL. Les échantillons proviennent tous d'une seule origine : le Portugal. L'analyse sensorielle des rondelles a été réalisée par la société SIBEL selon le protocole suivant : les rondelles sont macérées dans de l'eau minérale pendant 24 heures. Le macérât ainsi obtenu est alors soumis

au nez entraîné de deux experts. Les caractéristiques sensorielles du liège ont été traduites en utilisant un code numérique pour chacune des cinq intensités de défaut considérées soit 0 pour le liège sans défaut (témoin), 1 pour défaut identifiable, 2 pour défaut significatif, 3 pour défaut intense et 4 pour défaut très intense. Ces niveaux de défaut sont employés pour le contrôle de la qualité du bouchon chez SIBEL. Dans le Tableau 4 sont répertoriés les nombres de répétitions réalisées pour chacun de ces échantillons. Les intensités de défaut ont été au préalable déterminées par une analyse sensorielle conduite par SIBEL.

Tableau 4. Nombre de répétitions réalisées pour les échantillons de rondelles de liège présentant un défaut de moisi.

Intensité de moisi	Nombre de répétitions
0	10
1	17
2	13
3	14
4	12

3.1.2 Le DHS-MS : appareillage utilisé

Le dispositif instrumental de l'espace de tête dynamique – spectrométrie de masse (DHS-MS) mis en place est schématisé dans la Figure 11. Il s'agit d'un prototype de laboratoire non automatisable.

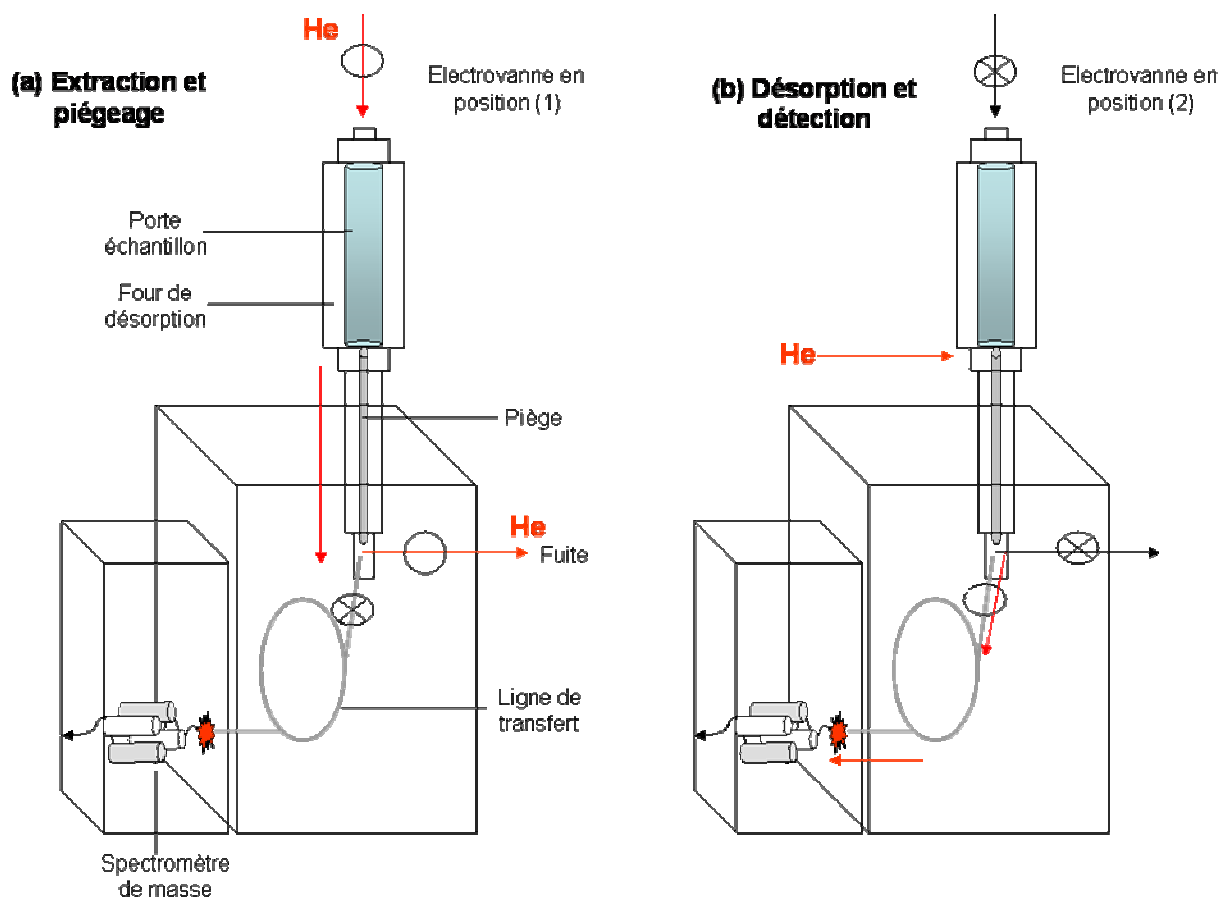


Figure 11. Dispositif instrumental pour le système DHS-MS.

3.1.2.1 Description du module d'extraction / injection

L'appareil de désorption thermique mis en œuvre dans ce travail est système "Thermal desorption Cold Trap injector" (TCT) de marque Chrompack[®]. L'injecteur TCT est composé de deux ensembles d'éléments : mobile et fixe. L'élément mobile est le tube d'échantillonnage (porte-échantillon) dans lequel on introduit l'échantillon à analyser. L'élément fixe se divise en deux compartiments : l'un est constitué d'un four de désorption thermique à l'intérieur duquel est placé le porte-échantillon ; dans l'autre compartiment se trouve le piège (colonne de pré-concentration) qui peut être ou non refroidi à l'azote liquide.

3.1.2.2 Mise en œuvre du couplage DHS-MS

L'analyse des échantillons par le couplage DHS-MS se déroule en trois étapes : extraction / piégeage, désorption, et enfin détection. Elles sont détaillées ci-dessous.

○ **Une phase d'extraction et de piégeage** au cours de laquelle l'échantillon est chauffé et balayé par un flux constant de gaz inerte (qualité N55, pureté 99,995% ; Air liquide, France)

soumis au contrôle d'une vanne multivoie. Au cours de cette phase, la vanne est placée en position 1 et le flux de gaz est dirigé en tête de l'extracteur. L'appauvrissement permanent de l'espace de tête en molécules volatiles déplace l'équilibre dans le sens favorisant la désorption des molécules volatiles de la matrice. Les composés volatils et semi-volatils ainsi extraits sont entraînés par le gaz inerte vers un piège, une colonne capillaire recouverte d'un film épais de phase stationnaire de polydiméthylsiloxane (Supelco SPB-1, 70 cm de long, 0,53 mm de diamètre interne, et 5 µm d'épaisseur de phase) (**Figure 11**).

○ **Une phase de désorption** au cours de laquelle la vanne multivoie change de position (position 2), faisant basculer le trajet du gaz vecteur de la cellule d'extraction vers la tête du piège, et l'extraction des effluents depuis le produit à analyser est alors stoppée. Un chauffage concomitant du piège permet de modifier ses propriétés de rétention et de libérer ainsi l'ensemble des molécules qui y sont retenues (**Figure 11**). Il est nécessaire que la montée en température du piège soit la plus rapide possible afin de limiter les réactions pouvant intervenir entre les molécules sous l'effet de la chaleur.

○ **Une phase de détection** au cours de laquelle les composés désorbés sont acheminés, grâce à la ligne de transfert (SGE DB-1, 1 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et d'une épaisseur du film de la phase stationnaire de 0,25 µm), dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse sans réelle séparation chromatographique en raison de la courte longueur de la colonne. Au niveau du spectromètre de masse, les molécules sont ionisées, fragmentées et les fragments ioniques triés selon leurs rapports masse sur charge (m/z) par l'analyseur de masse. L'ionisation des molécules introduites dans la source du détecteur de masse est principalement effectuée par impact électronique à 70 eV. Ce mode d'ionisation est très généralement utilisé afin d'assurer la reproductibilité des spectres de masse obtenus (Péres *et al.*, 2003). Le spectromètre de masse utilisé pour le DHS-MS développé dans cette étude est équipé d'un analyseur de masse à filtre quadripolaire (spectromètre de masse HP 5970 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). La détection des ions est assurée par un multiplicateur d'électrons qui produit un signal proportionnel au courant ionique, donnant le spectre de masse caractéristique. Le vide secondaire requis pour le spectromètre de masse est atteint grâce à une pompe turbomoléculaire d'un débit de 60 L/s.

3.1.2.3 Les paramètres maintenus constants au cours de l'analyse par DHS-MS

Compte tenu de la difficulté, voire de l'impossibilité de les faire varier (en raison de l'appareillage utilisé), un certain nombre de paramètres ont été maintenus constants.

○ **La masse du produit à analyser** : ce paramètre a été fixé à 0,15 g en raison de la configuration du système de l'extracteur de l'espace de tête dynamique. Une augmentation de la taille de la cellule d'extraction (tube en acier inoxydable) aurait permis l'analyse d'une plus grande quantité de matière mais un tel montage n'était pas possible avec le prototype de laboratoire utilisé dans ce travail.

○ **La longueur du piège** : une longueur de 70 cm était imposée par la géométrie du système.

○ **La longueur de la ligne de transfert** : une longueur minimum de 1 m a été choisie car une longueur plus courte risquait de compromettre la perte de charge nécessaire à l'établissement du vide (10^{-5} Torr) au niveau du spectromètre de masse, et par conséquent le bon déroulement de l'ionisation des composés en sortie de la ligne de transfert.

○ **La température de la ligne de transfert** : la température de la ligne de transfert a été fixée à 200°C afin d'empêcher la sorption des composés transférés, le piège étant chauffé à 230°C.

○ **La température de l'interface du spectromètre de masse** a été fixée à 250°C.

3.1.2.4 Le signal acquis après analyse par DHS-MS

En raison de l'absence de colonne chromatographique, et donc de séparation des composés avant leur arrivée dans le détecteur, l'information spectrale globale obtenue par DHS-MS est un signal complexe. Celui-ci peut être considéré comme une empreinte spectrale globale, représentée par un spectre de masse moyen obtenu grâce à l'intégration du courant ionique total entre le début et la fin du pic de désorption. Cette empreinte se caractérise par son intensité et par l'ensemble des fragments de masses des composés ionisés. Toutefois, la complexité du signal ainsi recueilli rend son interprétation délicate. Il n'est donc pas aisé de définir les critères qui permettraient de guider l'optimisation des conditions expérimentales à l'instar de ce que pourraient être le niveau du signal ou le rapport signal sur bruit dans les analyses classiques. La mise en œuvre préalable d'une technique séparative, ici la chromatographie en phase gazeuse, peut alors s'avérer très utile. De plus, la GC-MS peut permettre l'interprétation des fragments de masse contenues dans les empreintes spectrales globales. La GC-MS associée au DHS a donc été employée dans la partie préliminaire de ce travail, afin de se rapprocher au plus près des conditions expérimentales du nez électronique.

3.1.3 Le DHS-GC-MS : appareillage utilisé

Le chromatographe utilisé est de marque Hewlett-Packard (HP) 5890 de série II (Agilent Technologies, Avondale, USA) couplé au spectromètre de masse HP 5970 (Agilent

Technologies, Palo Alto, USA). Les paramètres d'acquisition du spectromètre de masse ont été déterminés par la procédure de réglage automatique (*autotune*). L'intervalle des masses acquies était de 37-300 unités de masses atomiques (u.m.a). La bibliothèque de spectre utilisée était la *nbs49k* (*Office of Standard and Reference Data*, NIST). La colonne capillaire utilisée présente les caractéristiques suivantes : DB-5MS (phase stationnaire de 95% méthyl et 5% phenyl, J&W Scientific), longueur de 25 m, diamètre interne de 0,2 mm et épaisseur de phase de 0,33 μm . La séparation des composés volatils a été réalisée sous un flux d'hélium (qualité N55, pureté 99,995% ; Air liquide, France) avec un débit de gaz vecteur de 1 mL/min.

3.1.4 Méthodes statistiques utilisées

Trois méthodes ont été mises en œuvre pour exploiter les données : l'analyse en composantes principales (ACP), l'analyse de variance, et la régression des moindres carrés partiels.

3.1.4.1 Principe des méthodes

3.1.4.1.1 Analyse en Composantes Principales

L'ACP (Pigotti, 1986 ; Wold *et al.*, 1987) a été appliquée aux données du DHS-MS car elle contient un grand nombre de variables, certaines d'entre elles étant fortement corrélées. Un des principaux rôles de l'ACP est de réduire la dimensionnalité de la matrice de données de départ, tout en conservant une description aussi fidèle que possible de ses caractéristiques. La réduction de la dimensionnalité s'effectue par le calcul de nouvelles variables (composantes principales ou PC) caractéristiques des sources de variabilité des données de départ. Les composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Elles sont ordonnées selon l'information qu'elles contiennent, c'est-à-dire classées dans l'ordre décroissant de la variance expliquée, et sont orthogonales entre elles (Wold *et al.*, 1987).

Chaque composante principale (PC) est associée à une valeur propre et à un vecteur propre. Les valeurs propres ("eigenvalues") sont les mesures de la variabilité que contient la PC (pourcentage d'inertie). Les vecteurs propres ("loadings") sont les contributions factorielles, c'est-à-dire les contributions des variables de départ à la définition des composantes principales. Ainsi, les premiers vecteurs propres sont associés à la variabilité significative dans les données, c'est-à-dire à l'information, alors que les derniers vecteurs propres, associés à un très faible pourcentage de variance expliquée, sont associés à la variation aléatoire due au bruit dans les données.

La projection des variables originales sur les composantes principales permet de décrire celles ayant le plus contribué à leur construction. Les coordonnées factorielles ("scores")

correspondent à la projection des individus de départ sur les composantes principales. La représentation graphique des coordonnées factorielles sur les deux ou trois composantes les plus explicatives de la variabilité permet donc de visualiser l'organisation des échantillons (objets) dans l'espace bi- ou tridimensionnel des variables de l'ACP. La représentation graphique des contributions factorielles sur ces mêmes PC permet ainsi de définir l'origine des variables ayant participé à cette organisation.

3.1.4.1.2 *Analyse de Variance*

L'analyse de variance est une méthode univariée qui consiste à calculer, pour chaque point des réponses, la variabilité due aux groupes prédéfinis au sein des échantillons et la variabilité qui n'est pas due à ce groupement. La dispersion moyenne au sein des groupes est calculée et est appelée variance intra-groupe ou variance résiduelle notée VR. La dispersion de la moyenne de chaque groupe comparée à la moyenne générale des réponses est appelée variance inter-groupe ou variance de groupe notée VG. Si les groupes ont des valeurs très similaires pour une variable donnée, la variance VG sera très faible et, inversement, si les groupes sont très différents pour une variable donnée, la variance VG sera très importante.

3.1.4.1.3 *Régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares ou PLS)*

Le grand nombre de variables des empreintes spectrales du DHS-MS, ainsi que leur forte corrélation, nous ont amené à employer une modélisation par régression PLS (Geladi *et al.*, 1986). La régression PLS est une méthode de régression multivariée qui permet la construction de modèles prédictifs. Elle établit un lien quantitatif entre un ensemble de variables dites dépendantes **Y** (par exemple des données sensorielles) et un ensemble de variables dites indépendantes **X** (par exemple des données chimiques). La régression sur les variables dépendantes **Y** se fait par l'extraction de variables latentes (structures latentes, axes factoriels) extraites de la matrice des variables prédictives de **X**. La PLS construit ces variables latentes en prenant en compte la corrélation des variables de **X** et également la covariance entre les variables de **X** et de **Y**. Ainsi, la matrice **Y** guide la construction des facteurs explicatifs extraits de **X** (Martens *et al.*, 1986). Comme lors du calcul des composantes principales dans l'ACP, les premières variables latentes obtenues par PLS sont reliées à l'information dans les données, alors que les dernières sont associées au bruit.

L'efficacité du modèle dépend des variables latentes à prendre en compte. Leur nombre doit être limité pour éviter le sur-apprentissage, mais suffisamment élevé pour éviter le sous-apprentissage du modèle. En cas de sur-apprentissage (lorsque le nombre de variables latentes

pour construire le modèle est trop élevé), outre l'information présente dans les données on inclut aussi du bruit, ce qui conduit en général à un bon ajustement du modèle mais à un mauvais pouvoir prédictif. A l'inverse, le sous-apprentissage du modèle (lorsque le nombre de facteurs n'est pas assez élevé) évite d'inclure du bruit mais on omet aussi de l'information, ce qui conduit en général à une mauvaise modélisation et une mauvaise prédiction des données. Pour décider de la dimension du modèle, deux paramètres doivent être pris en compte : la qualité de l'ajustement aux données (estimée par le coefficient de régression) et la qualité de prédiction (évaluée par la somme des carrés des erreurs de prédiction ou PRESS (« Predicted Residual Error Sum of Squares »)).

Le choix du nombre de variables latentes peut s'effectuer par validation croisée (Wold *et al.*, 2001a), habituellement réalisée par la procédure "leave-one-out". La validation croisée est une méthode de sélection des modèles de prédiction. Elle détermine le modèle qui a la plus petite erreur de prédiction parmi plusieurs candidats. La validation croisée consiste à construire des modèles pour des nombres de variables latentes différents sur $n-1$ individus, puis de tester le modèle sur l'individu exclu. Cette procédure est répétée n fois, et la comparaison entre les valeurs prédites de \mathbf{Y} et les valeurs connues permet de calculer les valeurs de PRESS associées à chaque modèle (c'est-à-dire à chaque nombre de variables latentes possibles). Cette dernière est estimée par la somme des carrés des différences entre les valeurs à prédire Y et les valeurs prédites \bar{Y} par le modèle,
$$\text{PRESS} = \sum (Y - \bar{Y})^2.$$

La validation croisée est arrêtée lorsque chacun des n individus de \mathbf{X} a été indépendamment prédit. Pour accélérer les calculs, on peut également enlever, à chaque étape de la validation croisée, un groupe d'individus au lieu d'un seul individu. En général, l'erreur de prédiction (PRESS) décroît au fur et à mesure que le nombre de facteurs inclus dans le modèle augmente, jusqu'à atteindre un minimum, pour un nombre p optimal de variables latentes, avant de croître de nouveau lorsque la variabilité apportée par des facteurs supplémentaires n'apporte plus que du bruit. Lorsque le nombre optimal de variables latentes a été déterminé par la validation croisée, les coefficients \mathbf{b} du modèle PLS sont alors calculés, pour ce nombre p optimal de facteurs, et avec l'ensemble des individus. Une fois que le modèle de prédiction est choisi, il est nécessaire de s'assurer de sa validité en le testant sur un nouveau jeu d'échantillons connus. Les coefficients de régression \mathbf{b} sont alors utilisés pour la prédiction de nouveaux échantillons, en multipliant le vecteur \mathbf{b} par les données des nouveaux échantillons. La validité du modèle est évaluée par le calcul des valeurs des résidus c'est-à-dire de son erreur standard d'étalonnage (*Standard Error of Calibration* (SEC)) et de son erreur standard

de prédiction SEP (Standard error of Prediction) qui sont calculés à partir de la valeur de la PRESS. La SEC est estimée par la racine carrée des différences entre les valeurs à prédire Y et les valeurs prédites \bar{Y} par le modèle, divisées par le nombre d'individus de l'étalonnage

$$(n), SEC = \sqrt{\frac{(Y - \bar{Y})^2}{n}} \text{ ou, } SEC = \sqrt{\frac{PRESS}{n}}$$

La SEP est estimée par la racine carrée des différences entre les valeurs à prédire Y et les valeurs prédites \bar{Y} divisées par le nombre d'individus de validation (n'). Par rapport au PRESS, la SEC et la SEP présentent l'avantage d'être homogène à la grandeur étudiée.

Par ailleurs, un intervalle de confiance est associé aux valeurs prédites par le modèle. La méthode la plus communément utilisée établit une hypothèse de normalité des distributions ; l'intervalle de prédiction standard consiste alors à appliquer le test de Student aux valeurs prédites par le modèle (Wold *et al.*, 1984 ; Martens *et al.*, 2000 ; Wold *et al.*, 2001b), selon

$$\text{l'équation suivante : } t = \left| \frac{(Y - \bar{Y})}{SEC} \right|, \text{ pour les individus d'étalonnage, et } t = \left| \frac{(Y - \bar{Y})}{SEP} \right|, \text{ pour les}$$

individus de validation. Les échantillons sont rejetés par le modèle si la valeur du t de Student est $\geq 2,5$. Cette valeur correspond à un intervalle de confiance de 95%.

Dans ce travail les deux versions de la PLS (PLS 1 et PLS 2) ont été employées. Dans le cas de la PLS 1, Y est un vecteur (une seule variable dépendante). En PLS 2, la matrice Y est constituée de plusieurs colonnes et la décomposition de la matrice Y n'est pas optimisée pour chaque colonne de Y mais s'effectue sur l'ensemble de la matrice. Généralement, on applique la PLS 1 lorsque la différence entre les composants constitutifs des échantillons est connue (par exemple, lors de la prédiction de concentrations). La PLS 2 est plus souvent utilisée dans l'analyse discriminante lorsque la matrice Y est constituée d'autant de colonnes que de groupes, contenant des valeurs binaires : 1, si l'objet appartient à la classe et 0, si ce n'est pas le cas (Barros, 1999 ; Wold *et al.*, 2001b). On peut également utiliser la PLS 2 si les différentes valeurs des Y sont liées entre elles.

3.1.4.2 Mise en œuvre des méthodes statistiques

3.1.4.2.1 L'Analyse en Composantes Principales.

L'ACP a été réalisée sur le logiciel MATLAB (MATLAB pour Windows, version 4).

3.1.4.2.2 La régression aux moindres carrés 2 (PLS 2)

La PLS 2 a été réalisée avec le logiciel Win ISI (Infrasoft International, LLC, version 1.50.). La PLS s'effectue en deux étapes. Une étape d'étalonnage et une étape de validation du modèle.

3.2 Etude préliminaire de mise au point du DHS-MS

La mise en place d'une étude de caractérisation par capteurs ioniques implique la mise au point d'un dispositif instrumental capable de fournir des réponses spectrales répétables, reproductibles et caractéristiques du produit analysé. Afin d'évaluer le potentiel discriminant d'une telle approche, le tandem DHS-MS a été monté au laboratoire dans l'objectif de caractériser et évaluer la qualité olfactive du liège oenologique. Comme nous l'avons déjà souligné, le DHS présente l'avantage de favoriser l'extraction des composés volatils de la matrice car le gaz vecteur renouvelle l'espace de tête en continu, conduisant ainsi à un appauvrissement permanent de celui-ci en composés volatilisés. De plus le piège adsorbant du DHS employé présente une surface offrant une capacité de pré-concentration supérieure à celle qu'offre par exemple une fibre de SPME. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, le signal acquis par DHS-MS est complexe, ce qui rend la mise au point de cette technique particulièrement délicate. Les travaux décrivant la méthodologie de mise en oeuvre des capteurs ioniques (Dittmann *et al.*, 2000 ; Pérès *et al.*, 2003) préconisent l'analyse préalable de la fraction volatile des échantillon par des méthodes séparatives classiques telles que la GC-MS. De plus, les travaux de Pérès (Pérès *et al.*, 2002b) traitant de la mise en application d'un DHS-MS pour l'analyse de fromages, ont montré que la fragmentation et l'ionisation des composés volatils par DHS-GC-MS sont globalement proches de celles observées lorsque les molécules sont introduites en mélange. Cette observation indique que les recombinaisons des espèces ioniques des différents composés volatils sont limitées en analyse rapide par DHS-MS, lorsque le mélange volatile est introduit directement dans le spectromètre de masse. Ce point est important car si des interactions importantes entre les espèces ioniques avaient lieu, le pouvoir discriminant de la méthode aurait été fortement compromis.

3.2.1 Analyse préliminaire de la fraction volatile du liège par DHS-GC-MS

Des essais ont tout d'abord été menés pour choisir la programmation de la température de la colonne offrant la meilleure résolution (visuelle) des pics chromatographiques obtenus sur la

râpûre de liège. Ensuite, l'étude s'est portée sur les conditions de l'extraction par espace de tête dynamique. Enfin, une tentative d'identification des composés volatils a été entreprise.

3.2.1.1 Choix du programme de température de la colonne de séparation

La programmation de température de la colonne GC pour laquelle la meilleure résolution des pics a été obtenue est la suivante : 50°C (pendant 3 min), puis passage à 200°C à raison de 4°C/min.

3.2.1.2 Choix de la température et de la durée d'extraction

Trois températures d'extraction ont été étudiées : 100, 150 et 200°C pour des durées d'extraction de : 5, 10 et 30 minutes. Le choix de la température et de la durée d'extraction s'est basé sur le nombre et l'intensité des pics chromatographiques obtenus. La température et la durée d'extraction de l'échantillon pour lesquelles un maximum de pics a été obtenu en GC sont respectivement : 150°C et 30 minutes. A des températures plus élevées de 180 et de 200°C, les spectres de masse des pics les plus intenses montraient la présence des ions 95 et 96, caractéristiques des furanes. Ceci est probablement dû à la dégradation des molécules présentes dans l'espace de tête de l'échantillon, et à la formation de composés secondaires sous l'effet de la chaleur. Par conséquent, une température d'extraction de 150°C sera retenue dans un premier temps pour l'analyse par le couplage DHS-MS.

3.2.1.3 Tentative d'identification de certains composés

Le chromatogramme du liège (Figure 12) présente un total de 17 pics chromatographiques. Après leur intégration, une tentative d'identification, basée sur le temps de rétention et le spectre de masse de chaque pic chromatographique intégré, a été menée. Le spectre de masse de chaque pic a été comparé à une bibliothèque de spectres et aux résultats de GC trouvés dans les publications relatives aux analyses chromatographiques du liège. Les résultats de cette tentative d'identification sont consignés dans le Tableau 5. Les molécules proposées couvrent plusieurs familles. La plupart d'entre elles ont également été retrouvées dans des recherches traitant de l'identification des volatils du liège. On retrouve une grande diversité dans les composés volatils du liège, avec des acides organiques (acide 4-butoxybutanoïque, acide acétique) (Boidron *et al.*, 1984 ; Rigaud *et al.*, 1984), des furanes (2-furancarboxaldéhyde, 2H-pyran-2-one) (Boidron *et al.*, 1984 ; Rigaud *et al.*, 1984), des aldéhydes (décanal, (2E, 4E)- 2,4-nonadiénal, (2E, 4E)-2,4-decadiénal) (Rigaud *et al.*, 1984), des phénols (2-méthoxy-4-(2-propenyl)-phénol, 2-(1,1-diméthyléthyl)phénol, 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (Vanilline) (Boidron *et al.*, 1984 ; Rigaud *et al.*, 1984 ; Boidron *et al.*,

1988), des hydrocarbures aliphatiques (tétradécane, hexadécane, alcane) et des terpènes. On peut constater que l'une des molécules les plus intenses présente dans le chromatogramme du liège est la vanilline, dont les ions caractéristiques sont à 151 et 152 u.m.a. La présence de la vanilline dans l'espace de tête des échantillons analysés a été confirmée par comparaison de son temps de rétention et de son spectre de masse avec celui d'un étalon (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) utilisé comme référence. Le spectre de masse de la vanilline est présenté dans la Figure 13. Les spectres de masses des 16 autres pics chromatographiques sont quant à eux présentés en annexe 1.

Cette grande diversité de structures chimiques témoigne également d'une large diversité dans l'origine de ces molécules volatiles. Selon Vivas (Vivas *et al.*, 1997), dont les travaux de recherche ont trait aux précurseurs des arômes du liège, le chauffage du liège augmente de façon appréciable son potentiel olfactif, grâce à la dégradation de polymères pariétaux tels que les lignines et les polysaccharides. Ainsi, les dérivés furaniques obtenus par DHS-GC-MS seraient les principaux produits issus de la dégradation thermique des polysaccharides et de la cellulose du liège. Leur formation est favorisée par la présence de l'acide acétique qui est produit spontanément par chauffage du liège. Ces dérivés furaniques ont une odeur de caramel et d'amande grillée. Les phénols, les phényl-cétones et les aldéhydes phénoliques (dont la vanilline) seraient, quant à eux, issus de la dépolymérisation de la lignine par thermodégradation ou par dégradation microbiologique (Rocha *et al.*, 1996 ; Vivas *et al.*, 1997). Quant aux aldéhydes et aux hydrocarbures aliphatiques, ils proviendraient de la dégradation des acides gras issus des cires du liège ou de la partie lipidique de la subérine par oxydation ou par une dégradation enzymatique microbienne (par des lipoxygénases) (Rocha *et al.*, 1996). Enfin, les voies métaboliques des terpènes ne sont pas encore bien connues. Ils ne sont synthétisés que par les plantes et par certains microorganismes, et en général ces composés présentent une note aromatique plaisante (Rocha *et al.*, 1996).

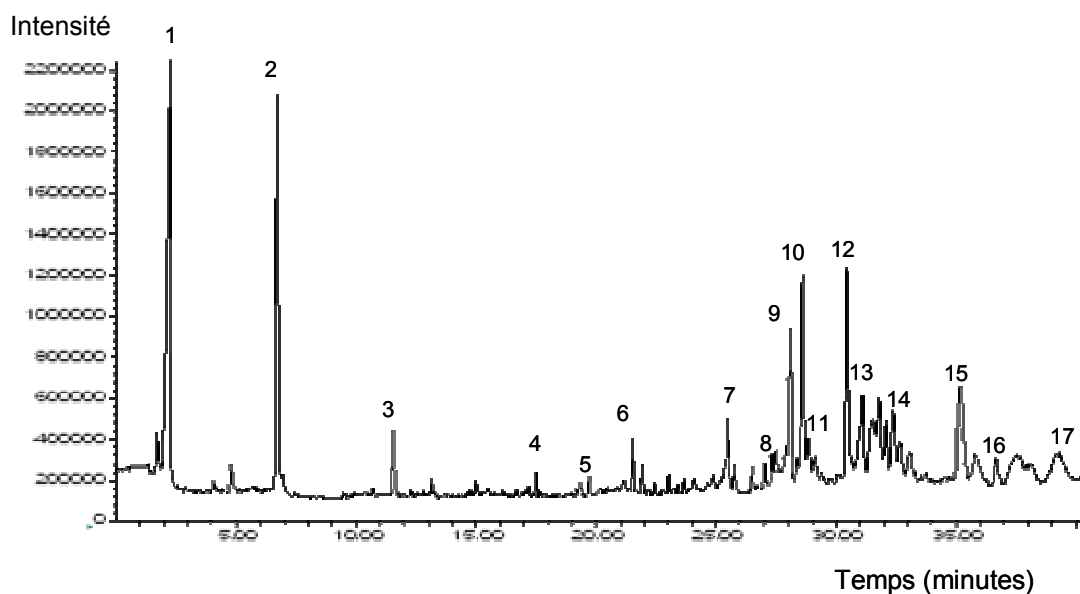


Figure 12. Chromatogramme d'un échantillon de liège obtenu par DHS-GC-MS.

Tableau 5. Résultats de la tentative d'identification des composés volatils et semi-volatils du liège.

Pic	Temps de rétention (min)	Composés identifiés	Famille chimique
1	02,247	Acide acétique	Acide carboxylique
2	06,714	2-Furancarboxaldéhyde	Furane
3	11,569	5-Méthyl-2-furancarboxaldéhyde	Furane
4	21,531	Décanal	Aldéhyde
5	21,914	(2E, 4E)-2,4-Nonadiénal	Aldéhyde
6	25,494	2-(1,1-Diméthyléthyl)phénol	Phénol
7	25,800	(2E, 4E)-2,4-Décadiénal	Aldéhyde
8	27,046	2-Méthoxy-4-(2-propenyl)phénol	Phénol
9	27,306	4-Butoxy-acide butanoïque	Acide carboxylique
10	28,606	4-Hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde (vanilline)	Phénol
11	28,848	Tétradécane	Hydrocarbure aliphatique
12	30,454	6,10-Diméthyl-5,9-undecadien-2-one	Cétone
13	31,816	Non identifié	Terpène
14	32,088	Non identifié	Terpène
15	35,165	1,2-Benzène acide orthophtalique	Acide carboxylique
16	35,790	Hexadécane	Hydrocarbure aliphatique
17	39,223	Alcane	Hydrocarbure aliphatique

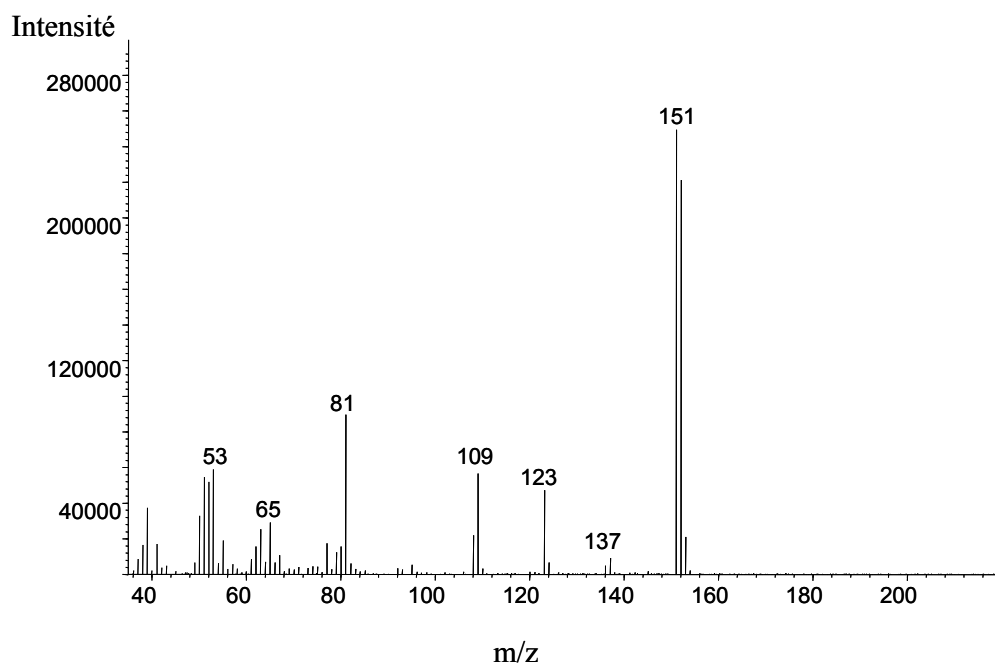


Figure 13. Spectre de masse de la vanilline

3.2.2 Analyse préliminaire de la fraction volatile du liège par DHS-MS

Pour la mise au point du DHS-MS, plusieurs paramètres ont été pris en compte afin de favoriser l'extraction par espace de tête des composés volatils : le débit d'extraction du gaz vecteur, la température de piégeage, la durée de l'extraction, la température de l'échantillon lors de l'extraction, et la granulométrie de l'échantillon. Enfin, une étude de répétabilité et de reproductibilité en fonction du jour de l'analyse a été menée afin de vérifier la stabilité de l'instrument. Le détail de cette étude est présenté dans les paragraphes qui suivent. Les critères permettant d'évaluer l'efficacité de l'extraction des composés volatils et semi-volatils des échantillons de liège se sont généralement fondés sur l'aire des pics de désorption (basée sur le courant ionique total ou TIC) ainsi que sur leurs coefficients de variation. Les aires ont été récupérées par intégration du TIC entre 0 et 10 minutes. En règle générale (sauf mention particulière), pour chaque essai, trois répétitions ont été réalisées afin de pouvoir estimer une moyenne des aires correspondant aux trois répétitions effectuées ainsi qu'un coefficient de variation (CV, ou écart-type relatif à la moyenne).

3.2.2.1 Le débit d'extraction du gaz inerte

Un débit important déplace plus rapidement les équilibres de libération de molécules volatiles, et peut donc influencer l'abondance et la richesse du signal. Afin d'étudier l'effet de la variation du débit du gaz sur l'intensité du signal du DHS-MS, nous avons fait varier la pression du système tout en fixant les paramètres des autres facteurs régissant l'analyse. Pour cela, nous avons agi directement sur la pression grâce à un régulateur de pression mécanique. Plusieurs essais ont été effectués avec des pressions en tête de colonne de 0,2 bar, 0,6 bar, et 1 bar au-dessus de la pression atmosphérique. Ces analyses ont été réalisées avec une température d'extraction de 150°C (compte tenu des résultats de l'étude préliminaire en DHS-GC-MS), une durée d'extraction de 10 minutes, une température de piégeage de 17°C (refroidissement à air comprimé), une température de désorption du piège de 230°C, et une durée de désorption du piège de 14 minutes. La

Figure 14 illustre les réponses (courant ionique total ou TIC) obtenues dans ces conditions. Elle indique que le TIC enregistré à une pression d'1 bar était le plus intense par comparaison aux TIC enregistrés avec les autres pressions étudiées. Par conséquent, la pression de 1 bar a été employée par la suite. Elle correspond à un débit du gaz inerte de 100 mL/min. Une valeur supérieure de la pression n'a pas été testée, compte tenu du débit déjà obtenu avec la pression de 1 bar.

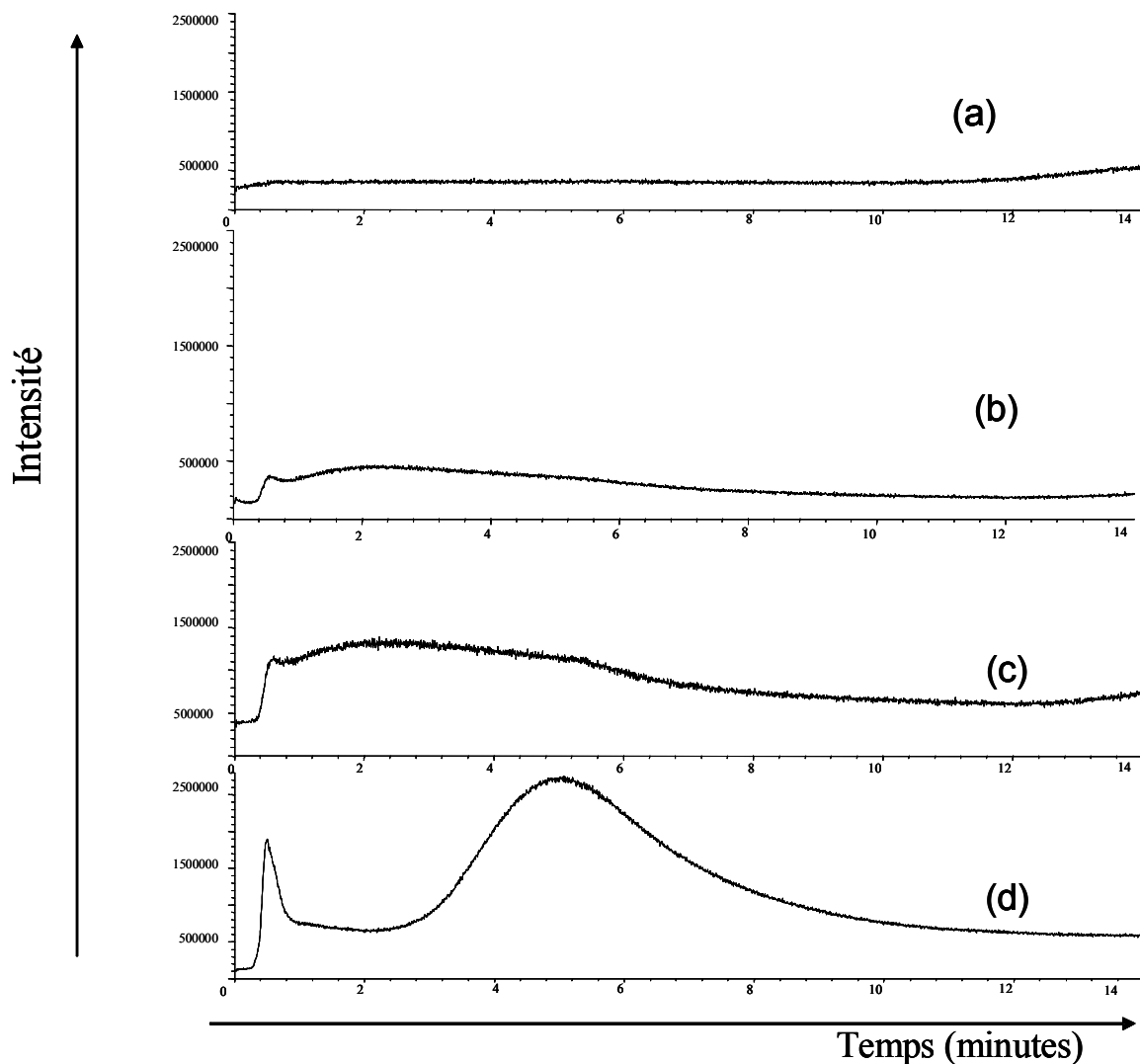


Figure 14. (a) Courant ionique total (TIC) correspondant à un blanc d'analyse à une pression de 0,2 bar. (b) (c) (d) TIC d'échantillons acquis respectivement à des pressions en tête de colonne de 0,2 ; 0,6 et 1 bar.

3.2.2.2 La température de piégeage

Afin d'améliorer la rétention et la concentration des composés volatils au niveau du piège, nous avons tout d'abord tenté de piéger les composés sur un piège de polydiméthylsiloxane (PDMS) refroidi à l'azote liquide à des températures de 0°C et de -10°C. Les autres conditions expérimentales sont celles indiquées plus haut.

Comme marqueur de l'efficacité du piégeage, nous avons choisi l'un des fragments spécifiques de la vanilline, plus précisément le fragment $m/z = 151$ u.m.a. En effet, nous avons pu identifier précédemment la vanilline comme l'une des molécules volatiles les plus intenses présentes dans le chromatogramme du liège. Le choix de l'un de ses fragments

caractéristique et abondant offre donc un marqueur relativement sensible de la rétention de la vanilline au cours du piégeage. La Figure 15 représente le pseudochromatogramme de l'ion m/z 151 obtenu par DHS-MS aux températures de piège de 0 et -10 °C et indique la disparition de cet ion pour les deux températures de piégeages testées, celle-ci étant plus marquée à -10 °C qu'à 0°C. La perturbation majeure observée sur l'ionisation de la vanilline est un fait fréquemment rencontré lors de l'extraction et de l'analyse de la fraction volatile des produits agroalimentaires, lorsque l'extraction est réalisée en mode dynamique avec un piégeage à froid, suivie d'une désorption et d'une analyse par GC-MS (Canac-Arteaga *et al.*, 1999 a, 1999 b, 2000). Ce fait est généralement attribué à la présence de vapeur d'eau dans le système et il se traduit par des modifications des profils chromatographiques avec un décalage du temps de rétention de certaines molécules, la suppression des molécules les plus volatiles, et la formation d'adduits. Dans notre cas précis, la vapeur d'eau serait libérée lors du chauffage de l'échantillon de liège ; elle se serait ensuite condensée au niveau du piège de PDMS en le couvrant d'un film d'eau, perturbant ensuite le piégeage des molécules volatiles du liège. Cette hypothèse nous semble d'autant plus vraisemblable que des travaux antérieurs semblent la confirmer. En effet, Carnac-Arteaga *et al.* (2000) ont analysé, avec un couplage purge-and-trap-GC-MS mettant en oeuvre un piège apolaire (Tenax), des échantillons de boeuf et de parmesan déshydratés contenant respectivement 2,3% et 25% d'eau. Une simulation des artéfacts survenant en présence de vapeur d'eau a ensuite été conduite en augmentant artificiellement l'humidité de l'espace de tête des échantillons, au moyen d'un morceau de laine de verre humide placé dans la chambre d'extraction. Leurs résultats ont montré que les modifications des profils chromatographiques des échantillons humidifiés par rapport aux échantillons secs survenaient en dépit de la nature apolaire du Tenax. Le changement des profils chromatographiques concernait en général les molécules de bas poids moléculaires possédant un ou deux atomes d'oxygène telles que les acides carboxyliques, cétones, etc. La disparition de la plupart des composés volatils après ajout d'eau dans l'espace de tête des échantillons a été expliquée par la non rétention de ces composés au niveau du Tenax en raison d'un mécanisme de compétition pour la sorption survenant entre les molécules d'eau et les molécules volatiles polaires pour le piège.

Intensité

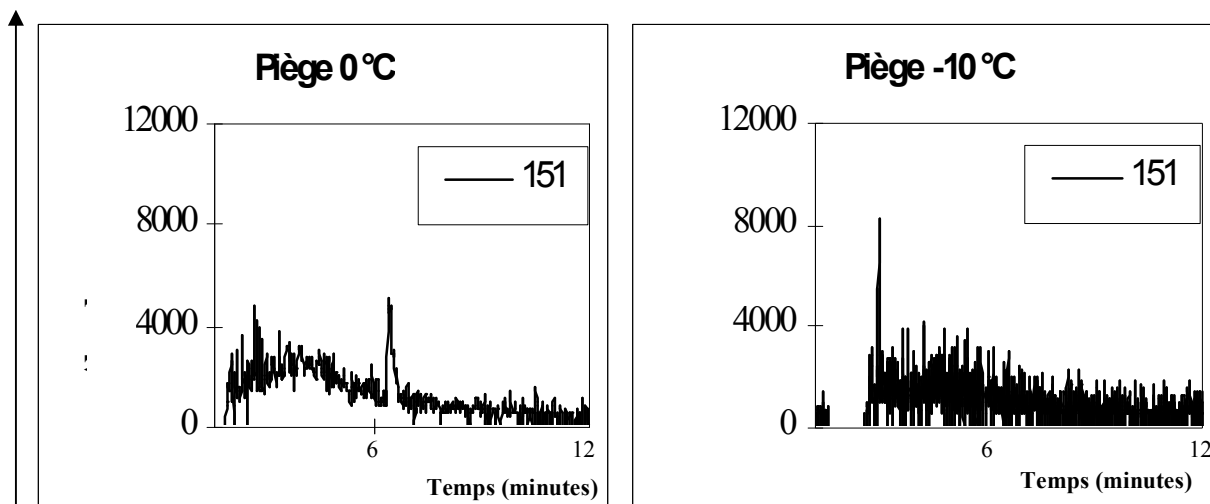


Figure 15. Pseudochromatogramme de l'ion 151 issu d'un échantillon de liège test, à une température de piégeage de 0°C et de -10°C.

A l'issue de cette expérience, deux solutions ont été envisagées pour assurer une température du piège supérieure à 0°C : la première était d'abolir le système de refroidissement du piège, et la seconde était d'autoriser un système de refroidissement à l'air comprimé. Chacune de ces deux solutions a donc été testée. Lors des essais réalisés sans système de refroidissement du piège, ce dernier atteignait une température d'environ 40°C pendant l'étape d'extraction et de concentration des volatils du liège. En revanche, le refroidissement du piège à l'air comprimé permettait d'atteindre une température plus basse, environ 17 °C.

La Figure 16 présente le pseudochromatogramme de l'ion 151 à ces températures de piégeage. Elle indique que l'ion 151 a bien été détecté grâce à l'amélioration du conditionnement du piège. Le piège conditionné à l'air comprimé a permis d'obtenir une intensité du signal de l'ion 151 environ 3 fois supérieure à celle obtenue sans conditionnement du piège. Ce résultat est confirmé par une étude systématique du résultat d'intégration du TIC. Cinq répétitions ont été faites (pour chaque condition de température du piège) et conduisent à l'histogramme de la Figure 17. Elle présente les résultats de l'intégration du TIC (courant ionique total) obtenu avec un piège refroidi à l'air comprimé et un piège non refroidi. Il apparaît qu'une plus grande quantité de matière (environ 5 fois plus) a pu être concentrée dans le cas du conditionnement du piège à l'air comprimé. C'est donc ce système qui a été retenu par la suite dans ce travail.

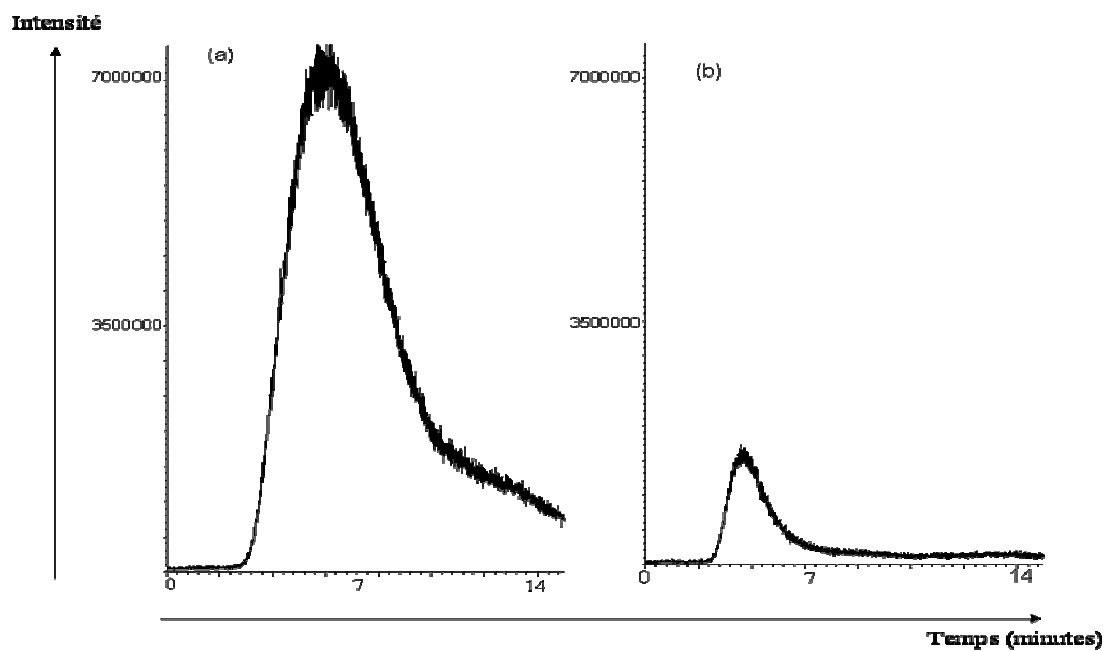


Figure 16. Pseudochromatogramme de l'ion 151 issu d'un échantillon de liège test, (a) avec un conditionnement du piège à l'air comprimé, (b) sans conditionnement du piège.

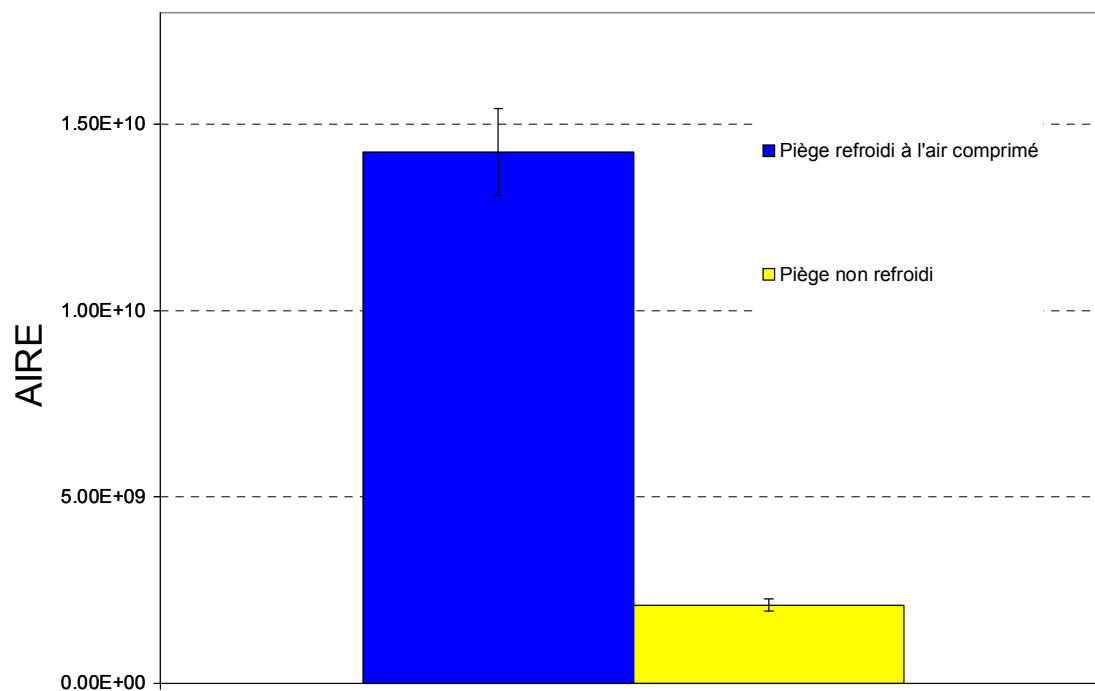


Figure 17. Histogramme présentant les résultats d'intégration du TIC pour un piège refroidi à l'air comprimé (environ 17°C) et un piège non refroidi (environ 40°C) et leur écart types respectifs calculé pour cinq répétitions.

3.2.2.3 La durée de l'extraction

La durée d'extraction de l'échantillon doit être suffisamment longue pour permettre l'extraction d'une quantité suffisante de matière mais assez courte pour limiter la durée de l'analyse. Dans le cas de l'analyse du liège par DHS-GC-MS une longue durée d'extraction était requise, puisque les essais effectués ont donné les meilleurs résultats pour une durée de 30 min comme indiqué précédemment. Cette durée ne correspond cependant aux objectifs de rapidité qui sont ceux du e-nose. Nous avons donc testé des durées moindres pour évaluer si elles conduisaient à des signaux très dégradés. Une cinétique d'extraction par DHS-MS a donc été entreprise pour des durées d'extraction plus courtes : 5, 8, 10, 12, 15 et 20 minutes à une température fixée d'extraction fixée à 150°C. Trois répétitions par durée ont été faites. La moyenne et l'écart type des aires en fonction de la durée d'extraction de l'échantillon sont présentés dans la Figure 18. Celle-ci indique que l'aire du TIC évolue de façon proportionnelle aux durées d'extraction étudiées. De plus, à partir de 12 minutes on distingue une diminution de coefficient de variation (CV), indiquant une meilleure stabilité du signal. Il est donc intéressant de constater que, pour les temps supérieurs à 12 minutes, les aires des TIC sont plus élevées pour des CV bas. Cependant, c'est la durée de 12 minutes qui a été choisie car elle représente la durée la plus courte correspondant à l'un des CV observés les plus bas (Tableau 6). La durée d'extraction de l'échantillon de 12 minutes a ainsi été maintenue dans la suite de ce travail.

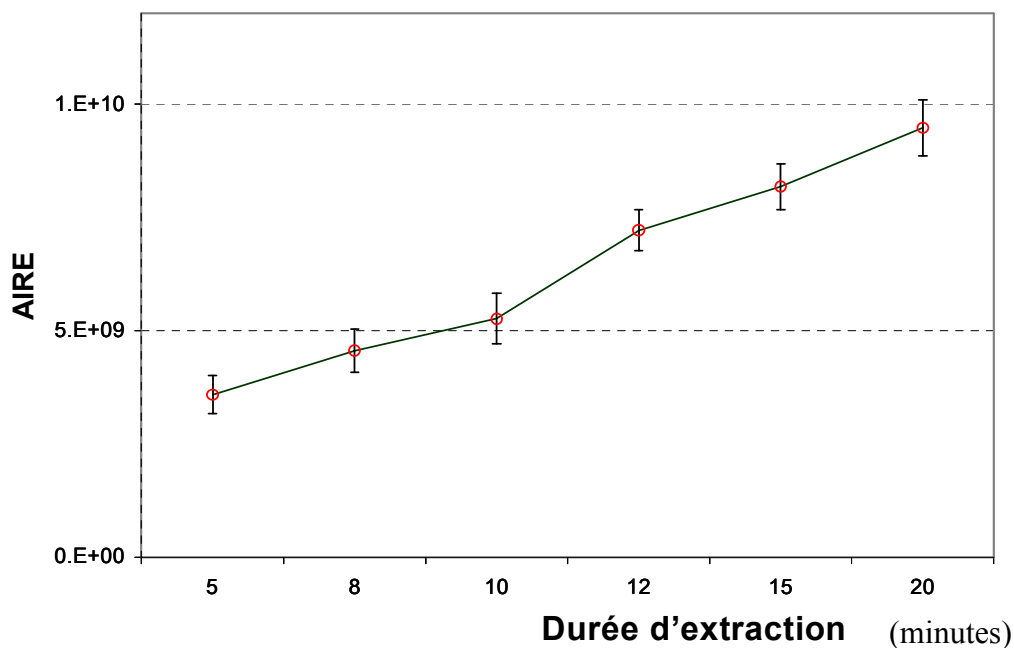


Figure 18. Effet de la durée de l'extraction sur la quantité de matière extraite par DHS-MS. La moyenne des aires et les écarts types calculés pour 3 répétitions sont représentés en fonction de la durée de l'extraction.

Tableau 6. Moyenne, écart type et coefficient de variation des aires des pics en fonction de la durée d'extraction du DHS-MS.

Temps (min)	5	8	10	12	15	20
Moyenne	3585474024	4558931725	5262296874	7220100020	8203563760	9474385760
Ecart type	415029793	481108460,6	558050009,6	456241414,4	536238670,2	622253967,4
CV	0,116	0,105	0,106	0,063	0,065	0,066

3.2.2.4 La température de l'échantillon

Les analyses par DHS-GC-MS ont montré qu'une température d'extraction de l'échantillon de 150°C permettait d'extraire le maximum de composés volatils sans signe de dénaturation de l'échantillon. Dans la configuration DHS-MS, l'effet de la température d'extraction a également été étudié sur une plus large gamme de températures : 60, 90, 100, 110, 120, 150, 180 et 200°C pendant une durée d'extraction fixée à 12 minutes. La Figure 19 représente la moyenne des aires pour 3 répétitions effectuées en fonction de la température d'extraction du liège. Les aires évoluent de façon proportionnelle à la température d'extraction. Nous avons

choisi la température de 150°C, pour laquelle l'intensité du signal était la plus importante sans signe visible de dénaturation de l'échantillon, car nous avons remarqué qu'au delà de 150°C, les ions 95 et 96 spécifiques des furanes étaient présents en grande quantité. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus en DHS-GC-MS. En conséquence, la température d'extraction de l'échantillon de 150°C a été choisie et maintenue dans la suite de ces travaux.

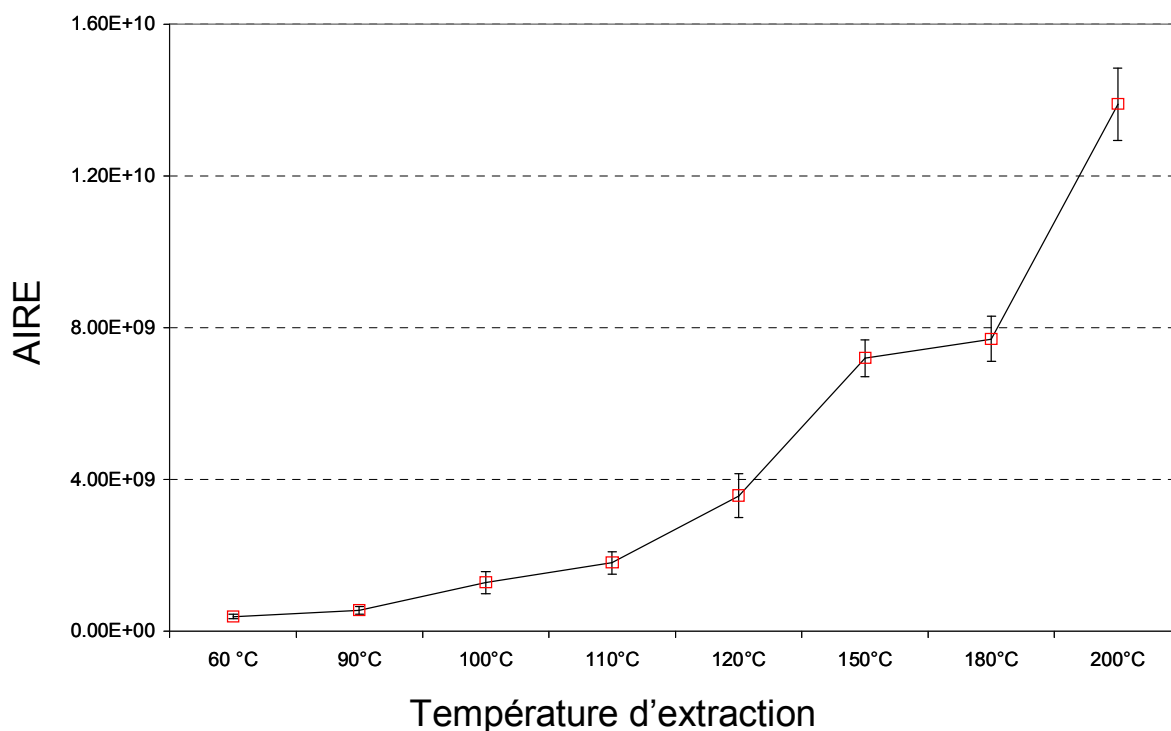


Figure 19. Effet de la température d'extraction sur la quantité de matière extraite par DHS-MS. La moyenne des aires et les écarts types calculés pour 3 répétitions sont présentés en fonction de la température d'extraction.

3.2.2.5 La granulométrie du produit analysé

Afin d'étudier l'effet de la granulométrie (taille des particules) des échantillons sur la répétabilité des analyses, des essais ont été entrepris sur un échantillon de liège test tamisé et non tamisé. Le choix de la taille des particules à retenir s'est fondé sur l'aire et la répétabilité des signaux. Celle dernière était évaluée par le coefficient de variation calculé sur la moyenne de cinq répétitions par granulométrie testée. Les essais ont été réalisés sur l'échantillon de liège test pulvérisé et tamisé à l'aide de tamis de 1 mm et de 0,7 mm de diamètre. Cela nous a permis de séparer et de récupérer les particules d'un diamètre inférieur à 0,7 mm, d'un diamètre compris entre 0,7 et 1 mm, et enfin d'un diamètre supérieur à 1 mm. Par ailleurs

l'échantillon de liège test non tamisé a été employé comme témoin. Les particules inférieures à 0,7 mm constituaient une fine poussière pouvant obstruer et encrasser le système et c'est pour cette raison qu'elles ont été écartées de l'analyse.

Cette étude a montré que pour l'échantillon ayant des particules de taille supérieure à 1 mm le signal était le plus intense. Cependant, il est associé au coefficient de variation le plus élevé (Figure 20 et Tableau 7). Or notre critère de choix est justement l'obtention d'un coefficient de variation le plus faible possible. Celui-ci est plus faible pour les granulométries comprises entre 0,7 et 1 mm, et pour les particules de liège non tamisées, et le signal présente dans ces deux cas un coefficient de variation équivalent. Par conséquent, à la suite de ce résultat, nous avons choisi d'exclure l'étape de tamisage des manipulations afin de simplifier la préparation de l'échantillon.

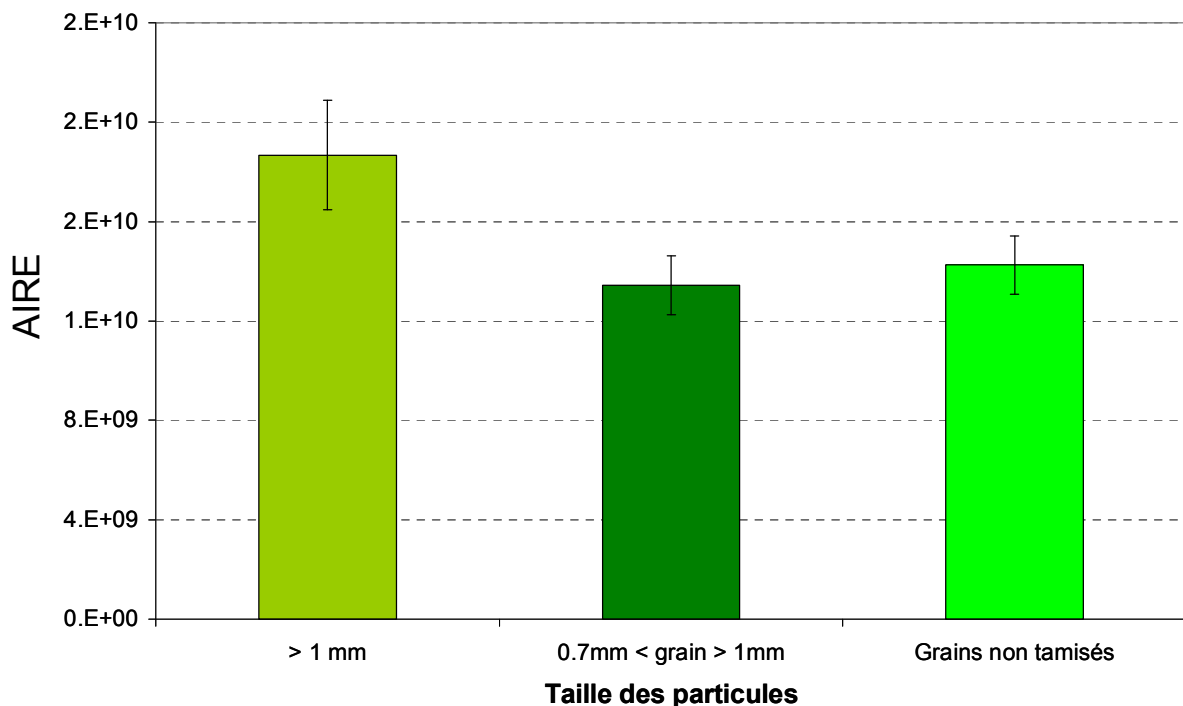


Figure 20. Influence de la granulométrie des échantillons sur la quantité de matière extraite du signal du DHS-MS. La moyenne et l'écart types des aires des pics de désorptions de cinq répétitions sont présentés en fonction de la taille des particules de liège.

Tableau 7. Influence de la granulométrie des échantillons sur la répétabilité du signal du DHS-MS.

Diamètre des particules	> 1mm	0,7mm - 1 mm	Grains non tamisés
Moyenne	18675924885	13450730201	14255430060
Ecart-type	2203459527	1182242417	1173369585
CV	0,118	0,088	0,082

3.2.2.6 Stabilité du signal en fonction du jour de l'analyse

Après avoir fixé les différents paramètres de l'analyse, nous avons effectué une étude de répétabilité et de reproductibilité de la méthode d'analyse, basée sur une analyse de variance selon la norme ISO 5725 (Feinberg, 1996). Pour cela nous nous sommes placés dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité définies comme suit : les conditions de répétabilité sont obtenues lorsque les mesures sont réalisées dans des conditions similaires c'est-à-dire par un même opérateur, sur un même instrument ou avec une méthode unique et dans un délai court. Les conditions de reproductibilité sont obtenues lorsque l'on introduit dans les mesures une ou plusieurs sources de variabilité telles que l'emploi d'un instrument différent, un autre opérateur ou un délai entre les mesures.

Afin de répondre aux conditions de répétabilité et de reproductibilité, l'échantillon liège test a été analysé en réalisant trois répétitions par jour, durant 3 jours. L'analyse de variance a ensuite été menée sur les résultats correspondant à l'intégration du courant ionique total (TIC) entre les périodes de 0 à 10 minutes. L'analyse de variance employée permet de calculer d'une part, une variance de répétabilité notée S^2_r , qui estime la dispersion minimale des résultats et, d'autre part, une variance de reproductibilité notée S^2_R , qui estime la dispersion maximale des résultats. Celle-ci englobe à la fois la variance de répétabilité (S^2_r) et la variance due aux facteurs non contrôlés, soit la variance dite inter-jour et notée S^2_j . Le détail des calculs est présenté en annexe 2. L'étude de variance a permis également de calculer les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité, mais ceux-ci n'indiquent pas si les valeurs obtenues sont trop élevées. Nous avons alors fait appel au modèle empirique proposé par Horwitz et cité dans l'ouvrage de Feinberg (Feinberg, 1996). Ce modèle empirique fournit une formule de calcul du coefficient de variation limite de la reproductibilité noté CV_{lim} (annexe 2) en fonction de la moyenne des analyses. Les coefficients de variation de

répétabilité ($CV_r = 5,29\%$) et de reproductibilité ($CV_R = 8,98\%$) sont tous deux inférieurs au CV_{lim} calculé (12%) et sont donc acceptables selon le modèle d'Horwitz (Tableau 8).

Tableau 8. Estimation de la stabilité du signal du DHS-MS par une étude de variance.

S_r^2	4,96E+17
S_j^2	9,30E+17
S_R^2	1,43E+18
S_r	7,04E+08
S_R	1,19E+09
CV_r	5,29%
CV_R	8,98%
CV_{lim}	12%

3.2.2.7 Conclusion

Cette partie a exposé les principales étapes de mise au point du couplage espace de tête dynamique-spectromètre de masse (ou nez électronique à capteurs ioniques). Les conditions expérimentales pour lesquelles nous avons obtenu un signal répétable et reproductible sont résumées dans le Tableau 9 suivant.

Tableau 9. Les paramètres expérimentaux du DHS-MS à l'issue de l'étude de mise au point de l'instrument.

Paramètre mis au point	Condition expérimentale
Température d'extraction	150°C
Durée de l'extraction	12 min
Température du piège (système de refroidissement à l'air comprimé)	17°C
Débit du gaz inerte	100 mL/min

Les conditions expérimentales ainsi mises au point resteront inchangées dans la suite du travail mené avec le DHS-MS. La durée totale de l'analyse par cette technique est au final de 26 minutes (12 minutes d'extraction et 14 minutes d'acquisition).

La seconde partie de notre étude concernant ce nez électronique a consisté à évaluer son pouvoir discriminant.

3.3 Evaluation du potentiel discriminant des empreintes obtenues par DHS-MS

Après l'étape de mise au point des paramètres régissant les analyses par DHS-MS, le pouvoir discriminant des empreintes acquises par DHS-MS a été testé au travers de deux études de caractérisation du liège par ses composés volatils : tout d'abord la caractérisation de l'origine géographique des bouchons de liège, et ensuite la mise en évidence de défauts des bouchons.

3.3.1 Etude de caractérisation des origines géographiques des bouchons de liège œnologique espagnols, portugais et marocains par DHS-MS

Des études antérieures de caractérisation et d'identification d'extraits de liège par couplage GC-MS ont montré que les teneurs et la nature des molécules contenues dans les extraits varient en fonction de l'origine géographique et des conditions de culture du chêne liège (Rocha *et al.*, 1996 ; Vivas *et al.*, 1997). Par cette étude, nous allons donc tester la capacité du capteur ionique à révéler l'hétérogénéité potentielle du chêne liège en fonction de son habitat.

3.3.1.1 Les données obtenues pour ces échantillons

Comme cela a déjà été souligné, le signal du DHS-MS se présente sous la forme d'un pic (pic de désorption) asymétrique d'environ 10 minutes de large (Figure 21). Sa largeur est plus grande que les largeurs de pics de désorption habituellement obtenues dans la littérature, vraisemblablement en raison de la dimension du piège employé. La rétention des molécules sur le piège dépend de plusieurs facteurs, tels que l'affinité des composés volatils avec la phase stationnaire du piège (PDMS ici), le diamètre du piège, sa longueur et le débit du gaz vecteur. Par conséquent, en diminuant la dimension du piège nous aurions probablement pu réduire la largeur du pic et le temps d'acquisition de l'analyse. Cependant, en raison de la configuration de l'appareil de l'espace de tête dynamique utilisé dans cette étude, les dimensions du piège sont restées inchangées puisque imposés par le système TCT.

L'intervalle de masse des empreintes spectrales acquises par DHS-MS était de 50 à 180 u.m.a. Cet intervalle est plus petit que dans le cas de l'analyse chromatographique par DHS-GC-MS car les fragments de masse inférieure à 50 u.m.a peuvent être d'origines multiples (air ambiant et gaz vecteur pour les fragments les plus abondants). Par ailleurs, les fragments de masse supérieure à 180 u.m.a ont été écartés car l'examen des empreintes spectrales (Figure 21) a montré qu'ils étaient peu abondants.

Le pic de désorption de chaque échantillon analysé a été intégré sur toute sa largeur (de 0 à 10 minutes) afin d'obtenir l'empreinte spectrale (spectre de masse moyen) spécifique de l'échantillon. Le bruit de fond de chaque analyse a été défini comme étant l'intégration du courant ionique total (TIC) dans l'intervalle de temps situé en dehors du pic de désorption entre 12 et 14 minutes. On a soustrait ce bruit de fond à chaque empreinte afin d'en réduire l'effet. La matrice finale des données a été construite par la superposition ligne par ligne de l'ensemble des empreintes spectrales (spectres de masses moyens) ainsi corrigées.

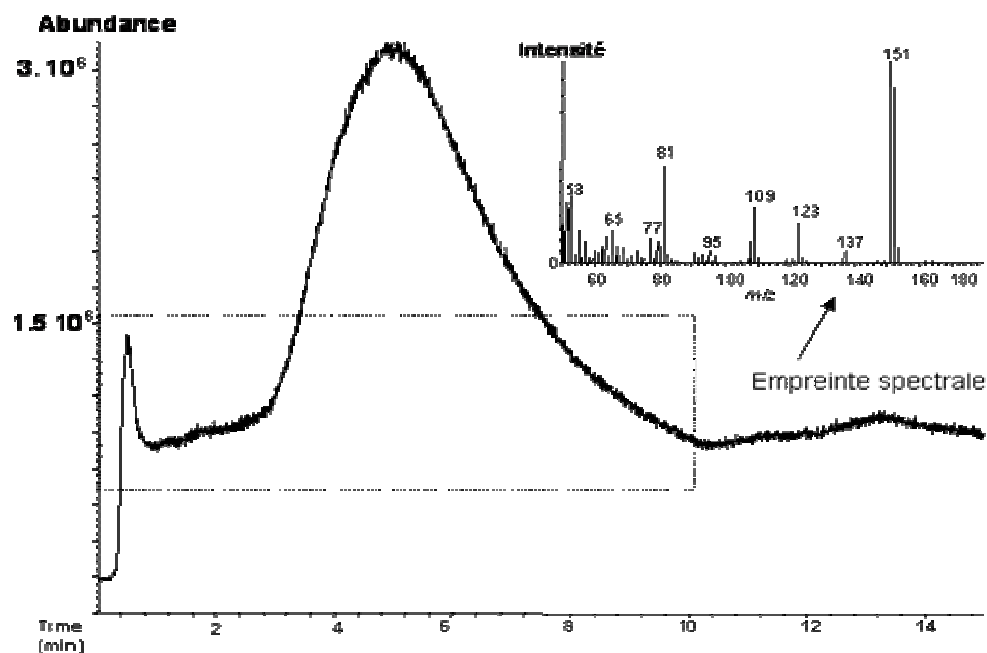


Figure 21. Courant ionique total d'un échantillon de liège portugais (P1) obtenu par DHS-MS.

Le nombre de répétitions réalisées par origine a varié selon la taille des lots de liège fournis par la société SIBEL comme indiqué dans la partie « Matériel et méthodes » de ce chapitre. Ainsi, dans cette étude, la matrice des données (nommée \mathbf{Xc}) est constituée de 51 lignes (individus ou échantillons) et de 131 colonnes (variables).

3.3.1.2 L'analyse des données

La variabilité des empreintes spectrales acquises par DHS-MS n'est pas directement interprétable sans l'emploi d'outils de statistiques multivariées. Ainsi l'ACP a été appliquée à la matrice des données \mathbf{Xc} (51 x 131) comme étape préliminaire pour nous permettre de visualiser la structure de la variabilité présente dans les données. Un modèle de PLS 2 a été appliqué à la matrice \mathbf{Xc} dans une seconde étape, dans le but de discriminer et de prédire

l'origine géographique des échantillons de liège à partir de leurs empreintes spectrales. Enfin, une étape de filtration des variables a été envisagée.

3.3.1.2.1 Résultats de l'Analyse en Composantes Principales

L'ACP a été appliquée aux empreintes spectrales des échantillons (individus) de liège marocains, espagnols et portugais contenues dans la matrice **Xc** brute sans aucun prétraitement statistique de la matrice. La Figure 22 représente la projection des individus de **Xc** sur les composantes principales PC1, PC2 et PC5. Ces trois composantes principales représentent collectivement 99,41% de la variabilité dans les données de **Xc** et ce sont celles qui permettent de visualiser le mieux l'organisation des individus. Ceux-ci sont bien séparés et organisés en trois groupes correspondant à leurs origines géographiques. La PC1 sépare le groupe d'échantillon espagnol (E1 et E2) des groupes marocains et portugais, la PC2 sépare bien le groupe d'échantillons portugais (P1 et P2) des groupes espagnols et marocains alors que la PC5 sépare en particulier le groupe d'échantillons marocains (M) des deux groupes restants. Aucune ségrégation des individus n'a été observée par rapport à la date d'acquisition des analyses.

Les vecteurs propres (*loadings*) associés à chaque PC sont présentés dans la Figure 23. Les vecteurs propres représentent les variables (*m/z*) ayant le plus contribué à la séparation des groupes. Les variables ayant le plus fortement contribué à la PC1 sont les *m/z* = 50, 57, 60, 61, 81, 109, 123, 151 et 152 u.m.a, à la PC2 les *m/z* = 57, 60, 61, 134, 151 et 178 u.m.a, et enfin à la PC5 les *m/z* = 57, 60, 68, 73, 97, 112, 126, 134, 160 et 178 u.m.a. Ces *m/z* ont été comparés à une bibliothèque de spectres constituée à partir des résultats de travaux publiés sur les volatils du liège. Le Tableau 10 présente les molécules chimiques possibles associées aux *m/z* ayant le plus fortement contribué aux composantes principales obtenues à la suite de l'ACP. Il est intéressant de constater que nous retrouvons des ions communs à ceux obtenus dans notre étude préliminaire par DHS-GC-MS, comme ceux de l'acide acétique (pic 1 du chromatogramme) et à la vanilline (pic 10).

Les PC3 et PC4 n'ont pas été représentées dans les résultats de l'ACP car la projection des individus sur ces composantes principales ne présentait aucune organisation en relation avec l'origine géographique du liège.

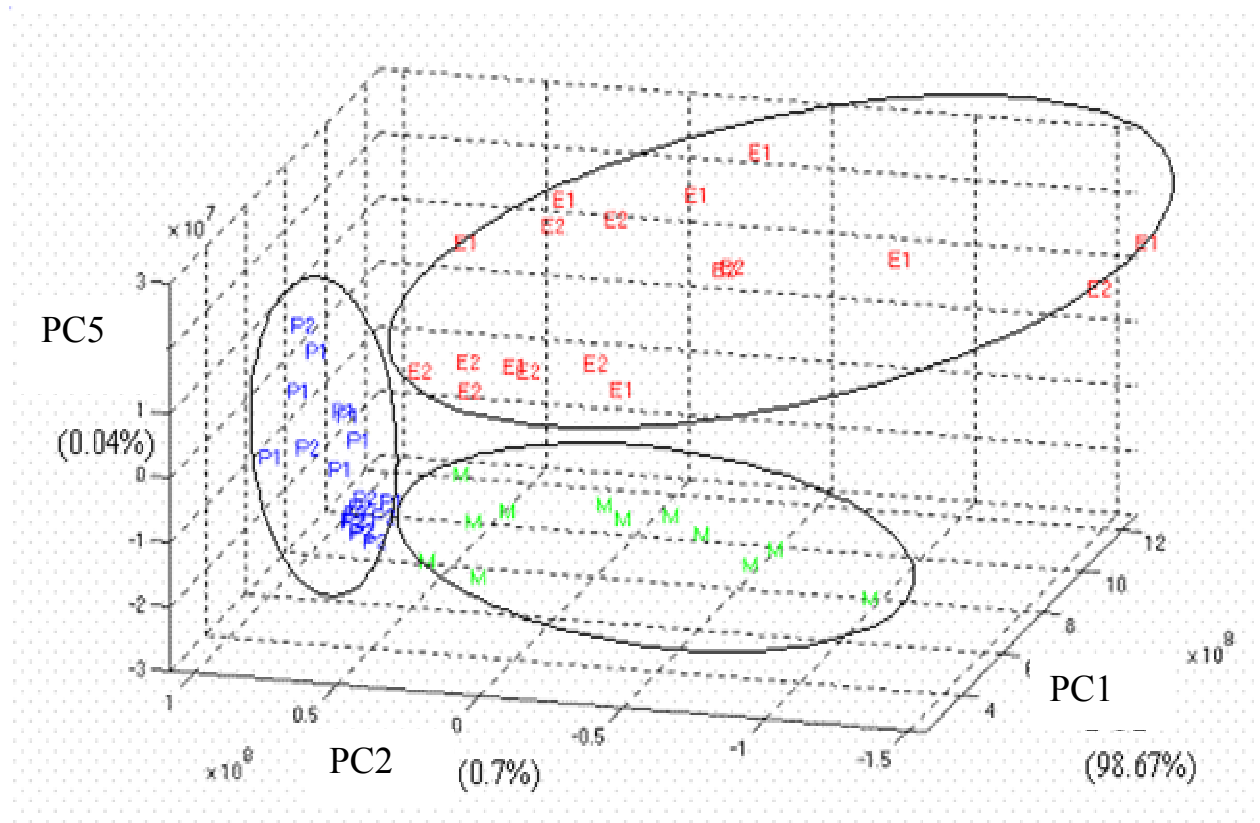


Figure 22. Projection tridimensionnelle des individus sur les composantes principales de l'ACP appliquée aux signaux des échantillons de liège espagnols (E1 et E2), portugais (P1 et P2) et marocains (M), réunis dans la matrice X_c .

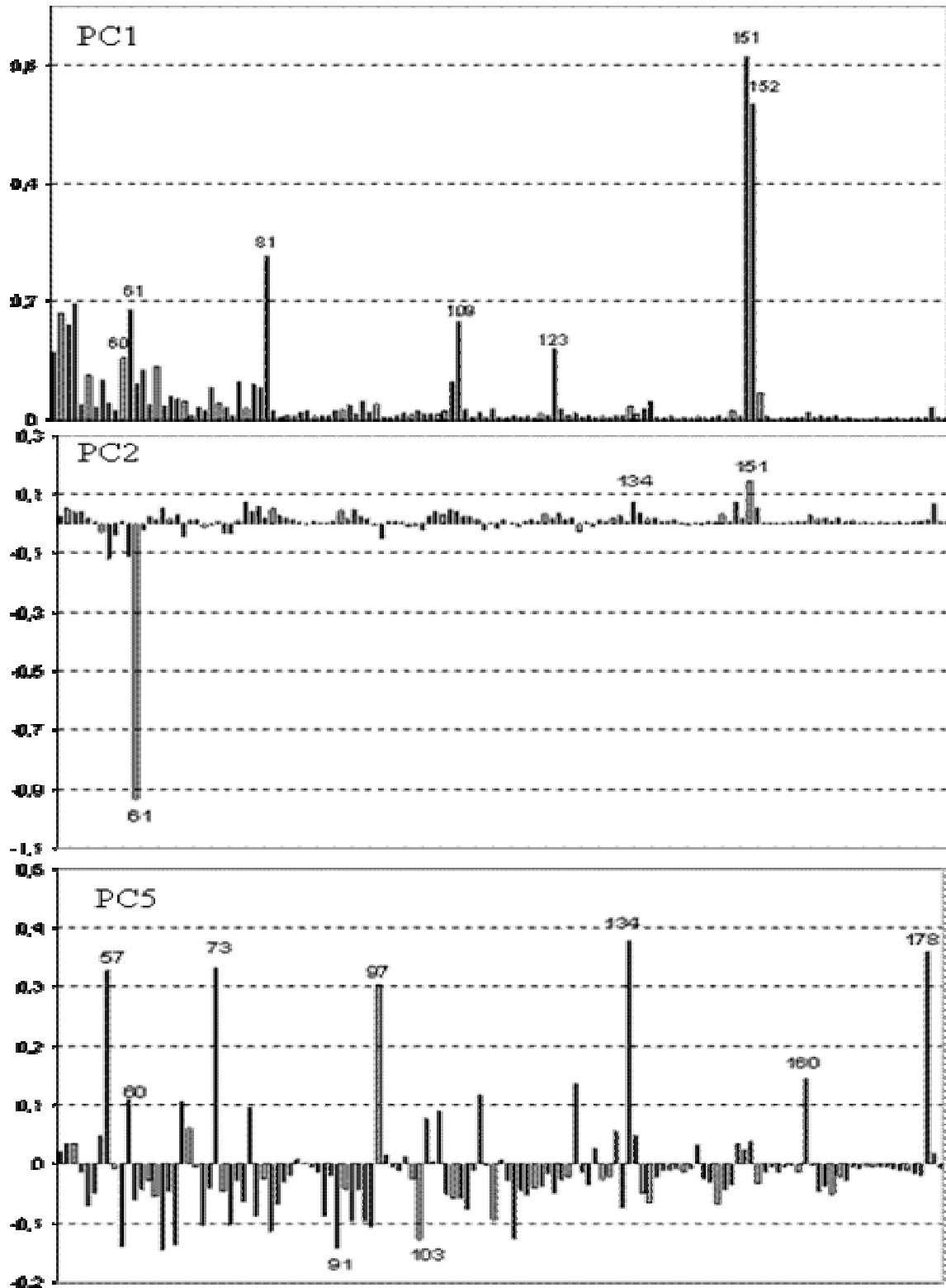


Figure 23. Vecteurs propres associés à PC1, PC2 et PC5.

Tableau 10. Les fragments (m/z) ayant le plus haut hautement contribué aux composantes principales ainsi que leur probable origine chimique.

m/z (a.m.u)	Molécules possibles	Références bibliographiques
50	Benzaldéhyde	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984)
57	2-Ethyl-hexanol	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984)
60	Acide acétique	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)
61	2,3,4,6-Tétrachlorophénol	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)
97	4-Hydroxy 3-méthoxy acide benzoïque	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)
109	1,7,7-Triméthylbicyclo[2,2,1]heptan-2-one (camphre)	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984)
134	1-Ethyl-2, 3-diméthyl-benzène	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)
81, 151, 152	4-Hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)
97, 134, 160	2,4,6-Trichlorophénol	(Boidron <i>et al.</i> , 1984 ; Rigaud <i>et al.</i> , 1984 ; Boidron <i>et al.</i> , 1988)

Cependant, la projection de l'ACP présente une remarquable dispersion des individus à l'intérieur de chaque groupe. Cette dispersion intra-groupe observée serait probablement due à l'hétérogénéité des échantillons, ainsi qu'à la méthode d'extraction employée, puisque cette dernière n'était pas automatisée. Ce facteur a probablement joué en faveur de l'augmentation de la variabilité intra-groupe des volatils du liège lors de leur extraction, concentration et de leur injection. Cette dispersion imputable à la mise en œuvre d'une technique d'espace de tête dynamique a déjà été rapportée dans la littérature. Ainsi, dans son étude de comparaison de trois méthodes d'extraction (SPME, espace de tête statique et extraction dynamique par purge-and-trap) pour l'analyse de fromage, Shaller (Schaller *et al.*, 2000) a montré que l'extraction dynamique était celle qui donnait les résultats les plus dispersés. Cette observation a également été soulignée par Marsili (Marsili, 1999, 2000) qui a trouvé une meilleure précision des répliqués par SPME comparée à la DHS pour l'analyse de fromage.

Néanmoins, la variabilité intra-groupe que nous observons est restée inférieure à la variabilité inter-groupe, ce qui a permis un classement des individus par rapport à leur origine géographique, et ce malgré le caractère non supervisé de l'ACP.

Nous avons alors pensé que l'emploi d'une méthode discriminante permettrait probablement de réduire cette dispersion tout en augmentant la distance entre les groupes par le choix de fragments de masses plus pertinents. Afin de choisir une méthode avec des statistiques robustes nous avons opté pour la PLS 2 car elle présentait les avantages de permettre de traiter des matrices ayant un grand nombre de variables corrélées, de discriminer et de prédire les caractéristiques d'échantillons nouveaux.

3.3.1.2.2 Résultats de la PLS 2

La PLS 2 s'effectue en deux étapes. Une étape d'étalonnage et une étape de validation du modèle comme cela est détaillé ci-dessous. Pour la validation du modèle, nous avons choisi de mettre en œuvre une validation externe.

○ *Etalonnage* : La matrice ayant permis de construire le modèle de PLS 2 est la matrice de données d'étalonnage \mathbf{Xc} (51 x 131). La matrice des variables à prédire \mathbf{Y} est constituée d'autant de lignes que la matrice \mathbf{Xc} (51 individus) et d'autant de colonnes que de groupes d'échantillons (3 colonnes). Chaque colonne correspond à un pays d'origine des échantillons. Dans une colonne donnée de \mathbf{Y} , les échantillons de même origine sont codés par le chiffre **2**, tous ceux qui ne sont pas de la même origine sont codés par le chiffre **1**. Ce type de codage est spécifique au logiciel Win ISI employé. La validation du modèle de régression PLS 2 a été réalisée par la méthode de validation croisée. Le modèle ayant l'erreur standard minimale a été obtenue pour 6 variables latentes. Les résultats de l'étalonnage présentent un coefficient de régression de 0,8106 ainsi qu'une erreur standard de l'étalonnage (SEC) de 0,2066, soit environ 20% de la différence entre les valeurs à prédire (2 et 1).

○ *Validation externe* : Le principe de validation externe consiste à mettre à l'épreuve le modèle de prédiction avec des données indépendantes de celles ayant servi à bâtir le modèle. Dans cette étude, le test du pouvoir prédictif du modèle de régression a été effectué sur les empreintes spectrales d'échantillons acquis à des périodes de 3 et de 8 mois ultérieures à la date d'acquisition des échantillons utilisés pour l'étalonnage du modèle. Cela nous a donc permis d'évaluer non seulement la qualité de prédiction du modèle discriminant, mais aussi d'évaluer la reproductibilité des analyses par DHS-MS. La matrice des données de validation a été construite de la même manière que la matrice de calibration, par la concaténation ligne par ligne des spectres de masses moyens corrigés pour les individus de validation. Ainsi, les matrices des données de validation (nommées \mathbf{Xv} et \mathbf{Yv}) se composent respectivement de 31

individus (échantillons de validation) et de 131 variables (\mathbf{Xv} (31 x 131)) et de 31 individus et de 3 variables (\mathbf{Yv} (31 x 3)). La matrice \mathbf{Xv} a ensuite été soumise au modèle de PLS 2.

Les résultats de la validation du modèle de PLS 2 avec \mathbf{Xv} (31 x 131) sont présentés dans la Figure 24. Elle montre la projection des valeurs prédites des individus d'étalonnage \mathbf{Xc} (51 x 131) et de validation \mathbf{Xv} (31 x 131), sur les trois axes des valeurs à prédire (1 et 2). Chaque axe représente une origine géographique : l'axe des X représente les valeurs à prédire des échantillons marocains, l'axe des Y celles des individus espagnols et enfin l'axe des Z , celles des individus portugais. La Figure 24 met en évidence, non seulement une discrimination satisfaisante des individus d'étalonnage, mais aussi une bonne qualité de prédiction des individus de validation, ceux-ci se positionnant correctement dans leur groupe d'origine respective. Le modèle de prédiction présente une faible erreur standard de prédiction (SEP) de 0,2659 soit 26% de la différence entre les valeurs à prédire du modèle. L'origine géographique des échantillons de validation a été correctement prédite pour tous les échantillons à l'exception de 6 parmi les 31, dont 4 individus espagnols (E1) et 2 individus portugais (P1). Les valeurs prédites de ces individus indiquaient une double appartenance à l'origine espagnole et portugaise. Leurs valeurs prédites étaient néanmoins incluses dans l'intervalle de confiance de leur groupe d'appartenance, évalué par le test de Student à $p = 0,05$.

La PLS a permis de réduire la variabilité intra-groupe, de maximiser la variabilité inter-groupe et de construire un modèle permettant de prédire avec succès les caractéristiques d'échantillons nouveaux. Par l'examen du processus de construction du modèle de PLS, il est aussi possible de mettre en évidence les variables ayant hautement contribué à la discrimination modélisée. Dans notre cas, ces variables contiennent l'information discriminante qui existe entre les échantillons des trois origines géographiques étudiées. Ainsi, la PLS peut servir à élaborer une méthode de sélection des variables les plus pertinentes pour rendre compte de l'origine du liège. Nous avons utilisé cette approche pour construire un filtre qui permet d'éliminer, dans une matrice de données spectrales, les variables qui ne sont pas porteuses d'information sur l'origine géographique.

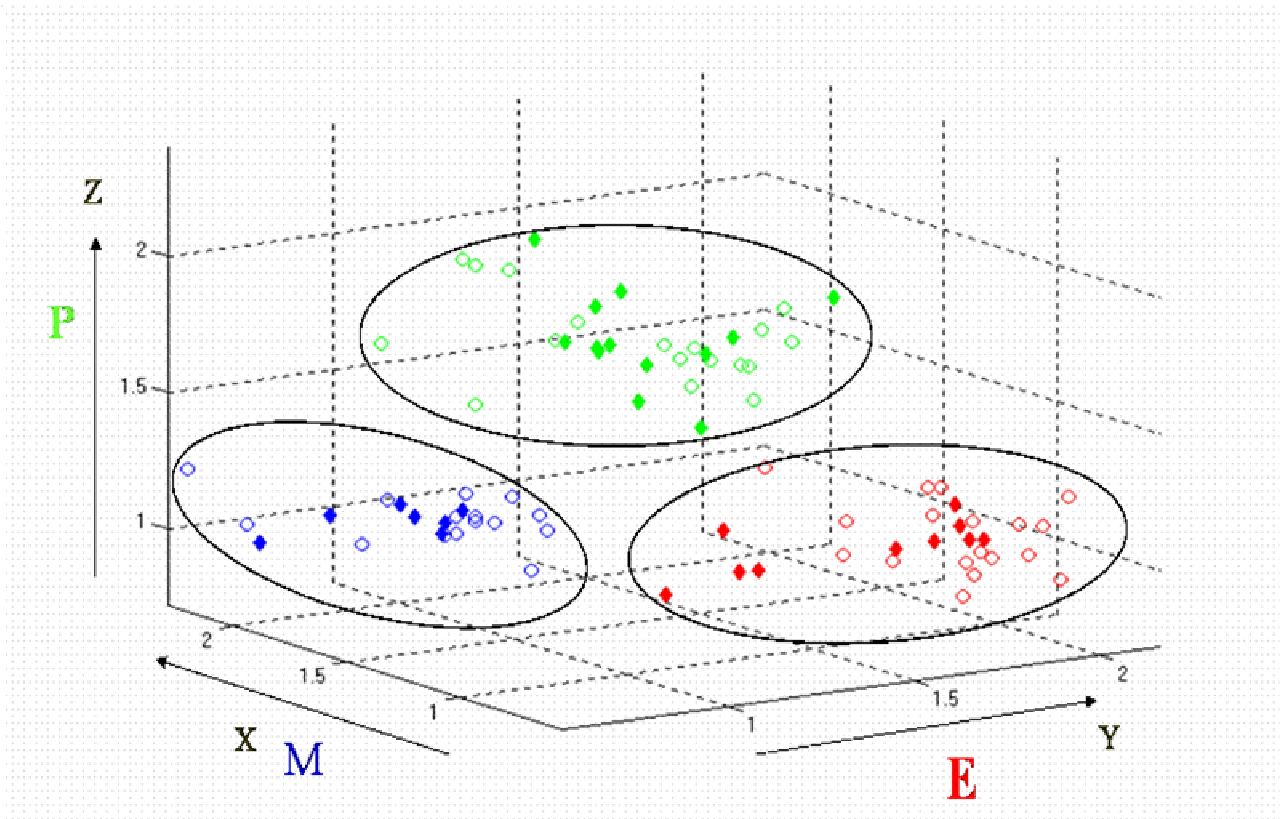


Figure 24. Projection des valeurs prédites des individus de X_c (\diamond) et de X_v (\blacklozenge) sur les trois axes des valeurs à prédire de chaque groupe d'origine géographique.

3.3.1.2.3 Résultats du filtrage des données

L'élaboration du filtre a consisté à appliquer une valeur seuil aux contributions des variables à la première variable latente de la PLS. La valeur seuil de 0,4 en valeur absolue a été choisie. Ainsi, toutes les variables ayant une contribution inférieure ou égale à 0,4 ont été ramenées à une valeur égale à 0, toutes celles ayant des contributions supérieures à 0,4 ont été ramenées à une valeur égale à 1. Le filtre, qu'on appellera F (131 x 131), est donc un vecteur constitué de valeurs binaires (0 et 1). L'opération de filtrage des variables de la matrice X_c (51 x 131) a consisté à multiplier X_c par F . Le filtrage a ainsi permis une réduction de 75% des variables de X_c résultant en une matrice réduite X_R (51 x 32) dont le nombre de variables est moins élevé que le nombre d'individus. Afin de vérifier l'information discriminante des 32 m/z ainsi sélectionnés et de visualiser l'effet de l'opération de filtrage sur les données de départ, une ACP a été réalisée sur la matrice réduite X_R . La Figure 25 présente la projection des individus sur la PC1 (98,26%), la PC2 (0,64%) et la PC4 (0,29%). La figure révèle effectivement une

meilleure séparation des groupes marocains, espagnols et portugais de la matrice X_R par comparaison à l'ACP précédente réalisée sur la matrice de départ X_c .

La Figure 26 met en évidence, parmi les 32 variables de la matrice filtrée, celles ayant le plus fortement contribué aux PC. Ainsi, la variable $m/z = 64$ a le plus fortement contribué aux valeurs positives dans PC1, $m/z = 112$ est la variable qui a fortement contribué aux valeurs négatives dans PC2 et la variable $m/z = 162, 166$ et 179 sont celles qui ont le plus fortement contribué valeurs négatives dans PC4.

Ainsi, nous avons donc pu isoler les variables (m/z) qui expliquent le mieux la différence entre les trois origines des échantillons. Néanmoins l'interprétation de leur origine chimique, au vu des spectres de masses des constituants connus du liège ne peut être qu'hypothétique, voire impossible.

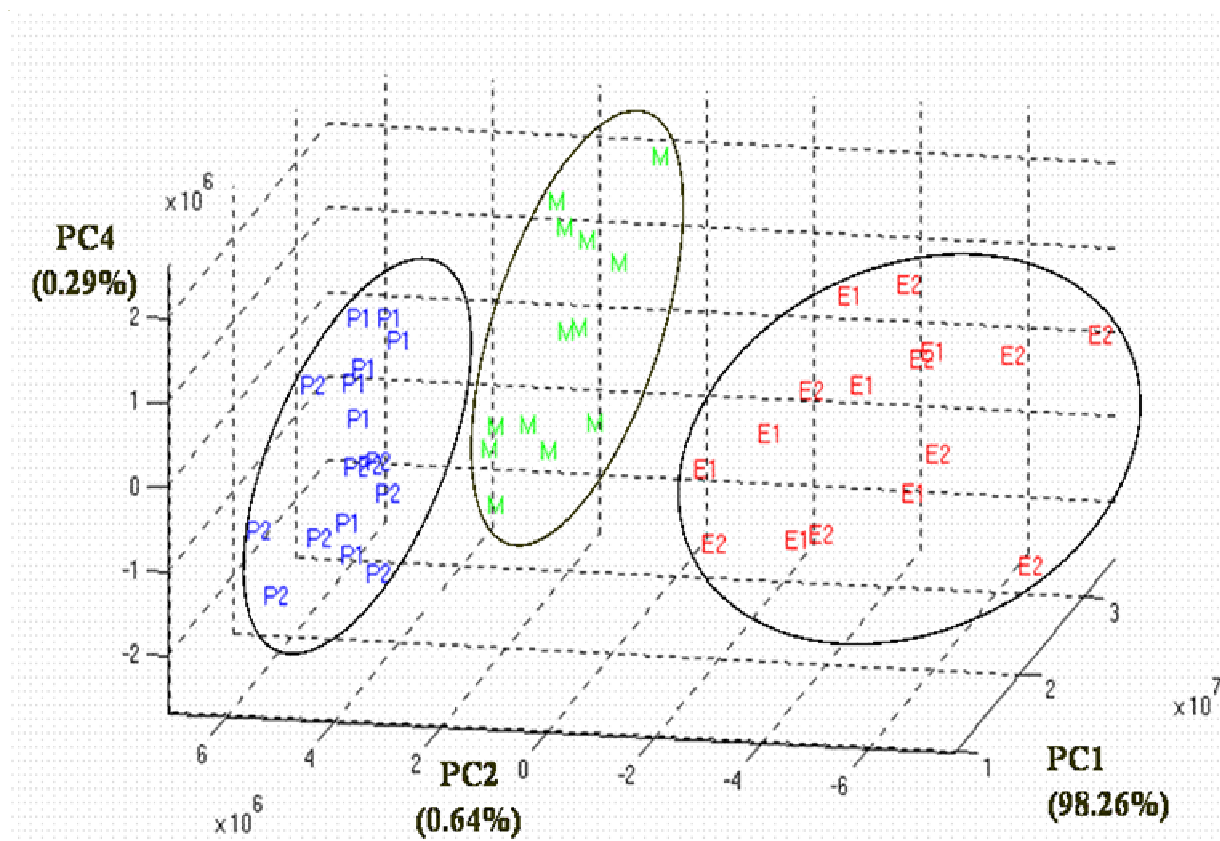


Figure 25. Projection tridimensionnelle de l'ACP des individus espagnols (E1 et E2), portugais (P1 et P2) et marocains (M) à partir de la matrice réduite X_R (51 x 32).

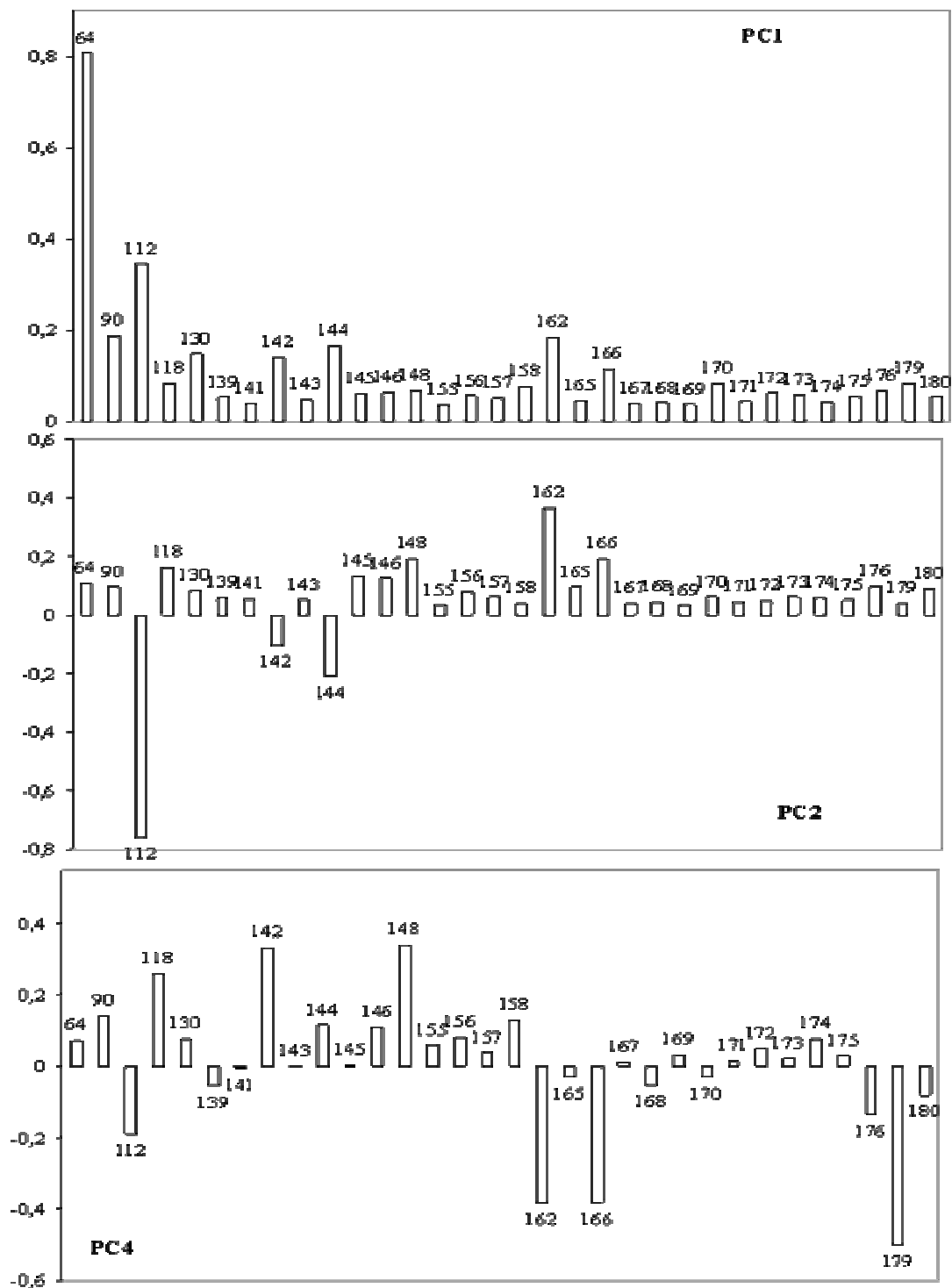


Figure 26. Vecteurs propres associés à PC1, PC2 et PC4.

3.3.1.3 Conclusion

Le couplage espace de tête dynamique - spectromètre de masse (DHS-MS) en jonction avec des méthodes d'analyses multivariées s'est avéré être une approche efficace pour la caractérisation rapide des origines géographiques des échantillons de l'étude à partir de leur

signature volatile. La superposition des spectres de masse de l'empreinte spectrale complexifie l'interprétation car les spectres de masses des composés chimiques spécifiques (susceptible de caractériser des différences entre les échantillons des origines géographiques étudiées) peuvent être masqués ou « noyés » par les spectres de masse des composés non spécifiques à l'objet de l'étude ou présents en grande quantité dans l'espace de tête du DHS-MS. Le filtrage des données peut alors être une solution permettant de mieux cibler les variables (m/z) qui contribuent le plus à la discrimination entre les échantillons.

3.3.2 Etude de caractérisation de l'empreinte globale de bouchons de liège œnologique présentant cinq intensités de défauts olfactifs par DHS-MS

Dans cette étude, des échantillons de liège présentant cinq intensités croissantes de défaut olfactif de type moisi, ont été analysés par DHS-MS. Le pouvoir du DHS-MS à discriminer ces échantillons a donc été testé.

3.3.2.1 Les données obtenues pour ces échantillons

Comme indiqué précédemment, l'empreinte obtenue prend la forme d'un pic asymétrique d'environ 10 minutes de large (Figure 27). Son intégration nous a permis d'obtenir la moyenne des spectres de masse enregistrés entre 0 et 10 minutes. L'intervalle de masses considéré dans ces conditions était de 50-220 uma (soit 171 valeurs). Pour chaque échantillon de liège analysé le bruit de fond a été évalué et soustrait de l'empreinte spectrale comme cela a déjà été décrit.

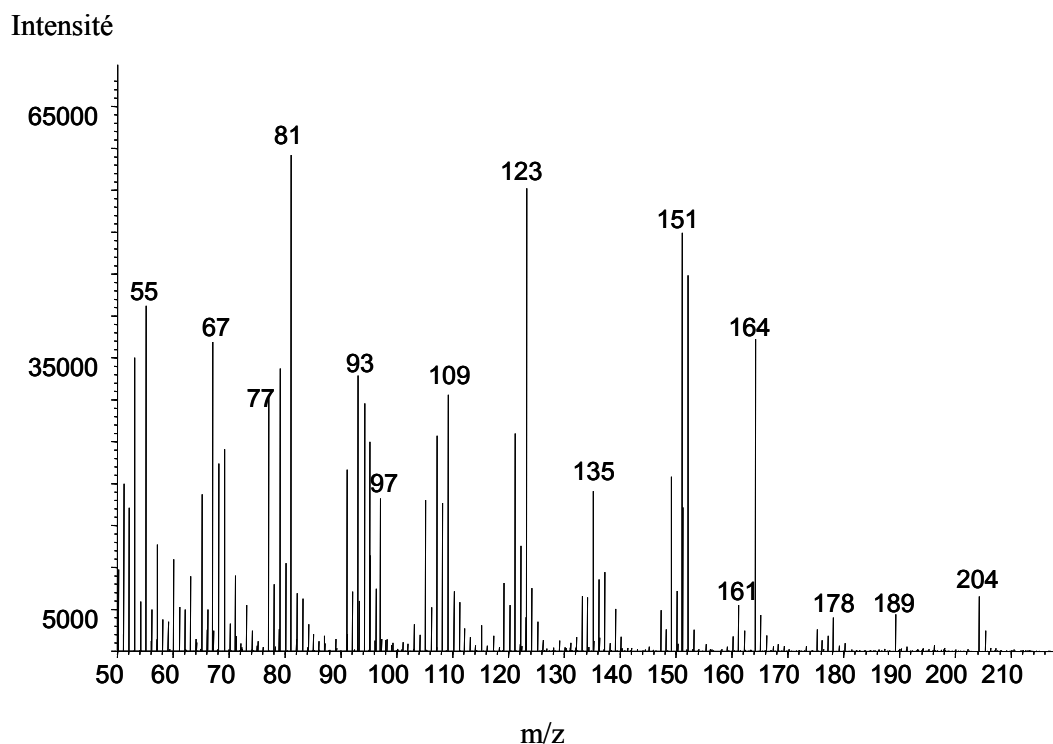


Figure 27. Empreinte spectrale d'un échantillon de liège portugais ayant une intensité 4 de moisi et obtenu par DHS-MS.

Comme cela a été précisé dans la partie « Matériels et méthodes » de ce chapitre, le nombre de répétitions par échantillon a varié du fait de quantités différentes reçues pour les lots. Au total, le nombre de répétitions, tous échantillons confondus, s'élève à 66. Ainsi, la matrice des données \mathbf{X} d'étalonnage se compose de 66 individus et de 171 variables. Par ailleurs, la matrice de validation \mathbf{X}_v se compose de 50 échantillons de validation correspondant à 10 répétitions par groupe d'échantillon de moisi et de 171 variables.

3.3.2.2 L'analyse de ces données

Dans cette étude, l'analyse des résultats s'est déroulée en trois étapes :

- (1) Réaliser une ACP, méthode chimiométrique non supervisée, afin de mettre en évidence une éventuelle structuration des individus selon les groupes « qualité ». Elle a été appliquée aux profils de désorption des 66 échantillons et des 171 m/z .
- (2) Réaliser une régression PLS 1, méthode chimiométrique supervisée avec une étape d'étalonnage et une étape de validation, afin de voir si les données du nez électronique peuvent être corrélées aux données sensorielles. Elle a été appliquée à la matrice \mathbf{X} (66 x 171) et à la matrice \mathbf{Y} (66 x 1), \mathbf{Y} étant un vecteur contenant les intensités de moisi allant

de 0 à 4. La validation du modèle a été réalisée grâce à un jeu de données de validation \mathbf{X}_v (50 x 171) et le vecteur \mathbf{Y}_v (50 x 1) indépendant, acquis un mois après le premier jeu de données d'étalonnage.

- (3) Réaliser une éventuelle mise à jour du modèle de PLS en élargissant sa base d'étalonnage (d'apprentissage), ce qui permet de vérifier la stabilité du modèle.

3.3.2.2.1 *Résultats de l'Analyse en Composantes Principales*

La Figure 28 présente la projection tridimensionnelle sur les PC1, PC3 et PC5 des individus de la matrice \mathbf{X} et qui représentent collectivement 94,1% de la variabilité présente dans les données. La structure de cette projection met en évidence l'existence de cinq groupes d'échantillons séparés et ordonnés par intensité croissante de défaut. Les variables ayant le plus contribué aux PC sont présentées dans la Figure 29. La PC1 semble contenir l'information chimique permettant de séparer les groupes (1), (2) et (3). L'examen détaillé des vecteurs propres sur la PC1 montre que ce sont principalement les $m/z = 151$ et 152 qui contribuent cette séparation. La PC3 sépare clairement le groupe de plus forte intensité de moisi (4) des quatre autres groupes. L'information chimique à l'origine de cette séparation est portée sur les contributions négatives des variables principalement représentées par les $m/z = 123$ et 164 . La PC5 oppose les individus témoins (0) des autres groupes de moisi. L'information chimique à l'origine de cette opposition se trouve dans les contributions positives de la PC5 c'est-à-dire pour les variables $m/z = 60$ et 95 .

Ces résultats suggèrent que la prédiction de l'information chimique relative à la qualité du liège peut être envisagée par une méthode prédictive et supervisée telle que la PLS 1. Il s'agit donc, dans la prochaine étape du traitement des données, de relier les données instrumentales aux données sensorielles du liège.

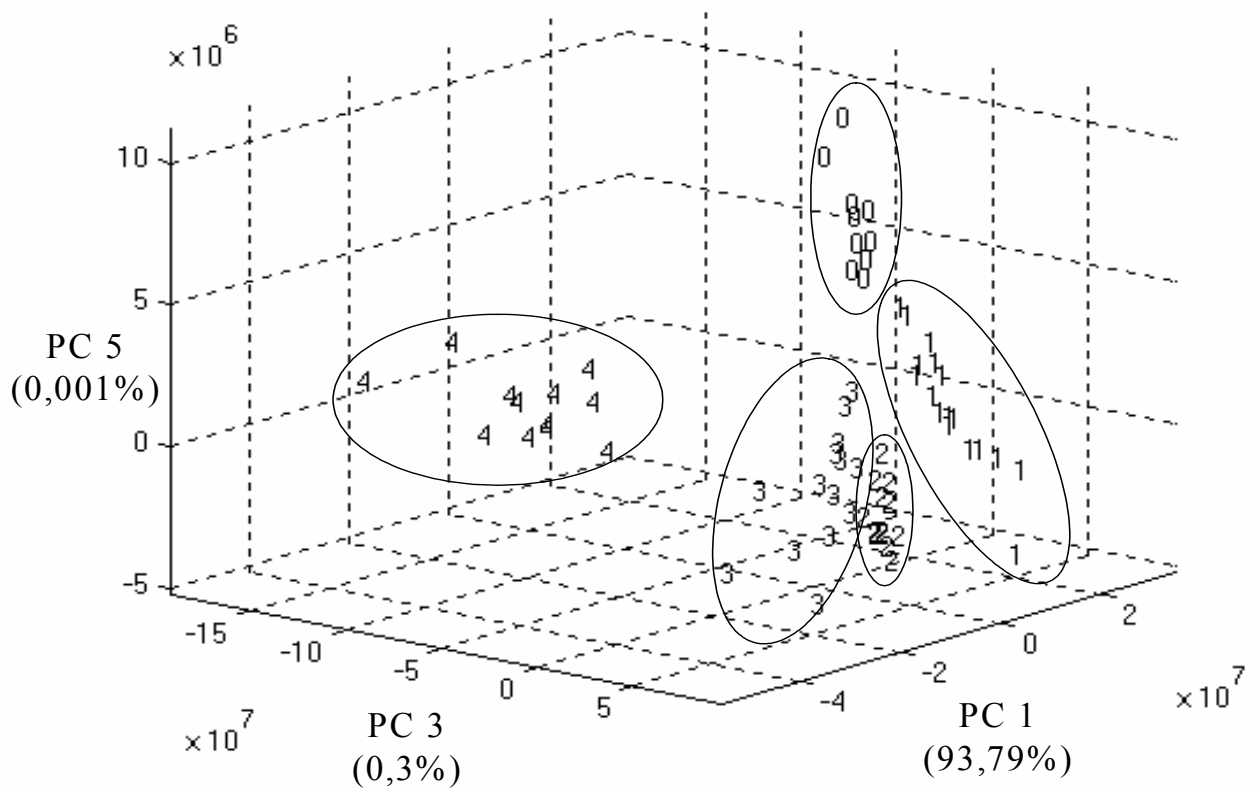


Figure 28. Projection tridimensionnelle des individus sur PC1, PC3 et PC5 de l'ACP appliquée à la matrice X (66 x 171) (les numéros 0 à 4 correspondant aux intensités de défaut de moisi des échantillons de liège).

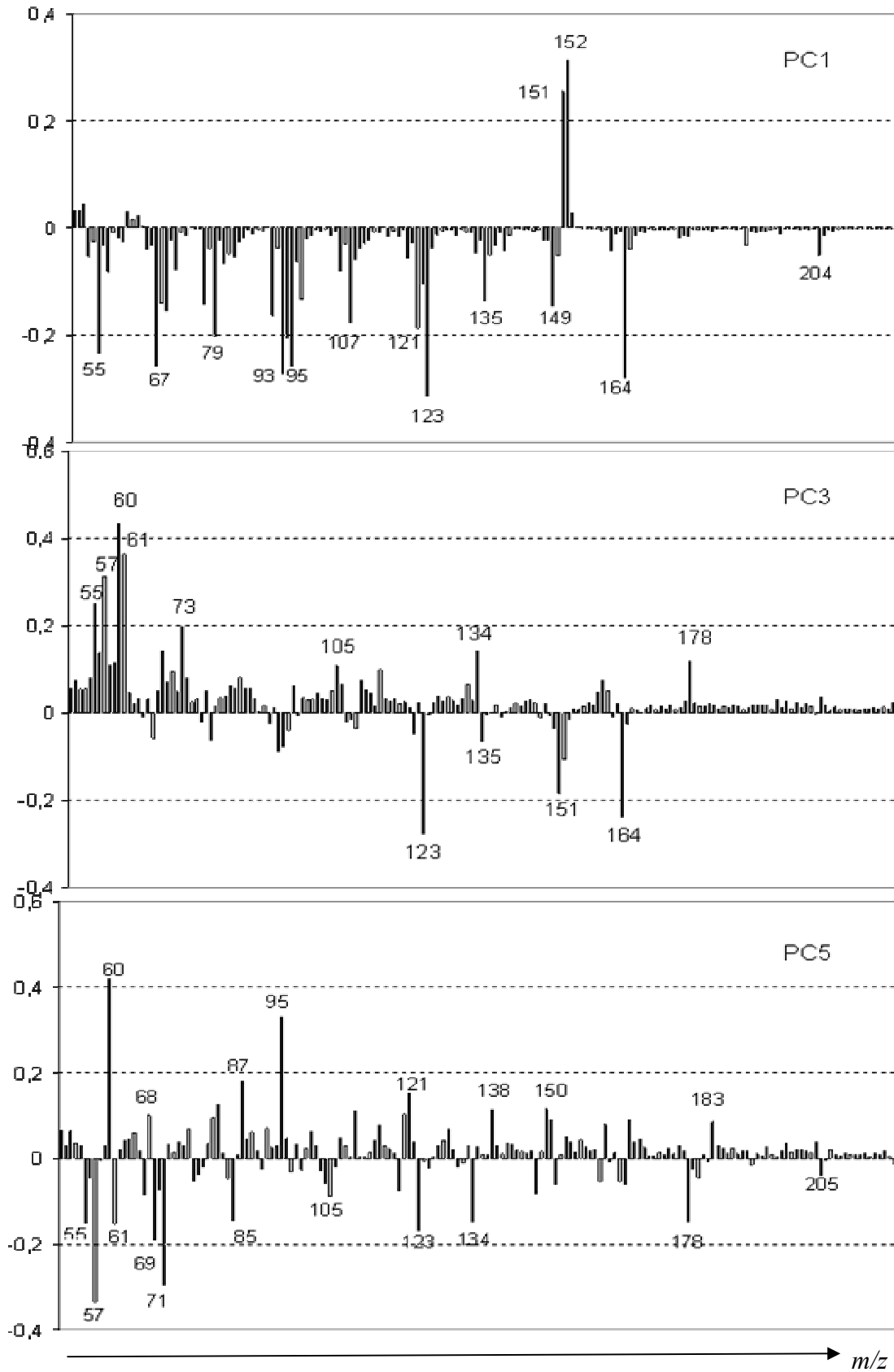


Figure 29. Vecteurs propres associés à PC1, PC3 et PC5.

3.3.2.2.2 Résultats de la PLS 1

L'erreur standard minimale du modèle d'étalonnage (SEC) a été obtenue pour 6 variables latentes principales. Les résultats de l'étalonnage présentent un bon coefficient de régression de 0,98 ainsi qu'une erreur standard de calibration (d'étalonnage) (SEC) de 0,22. Les coefficients b du modèle de PLS 1 sur X sont présentés dans la Figure 30. Leur examen ne dévoile pas de corrélation claire avec le spectre de masse spécifique du TCA ou du TeCA (associés généralement à ce défaut de moisi) excepté pour un ion, le $m/z = 97$ a.m.u, typique du TCA. L'intensité des coefficients b est élevée pour beaucoup d'autres ions qui peuvent provenir du liège lui-même ou de ses composés de dégradation lors de l'étape de désorption du liège. Ainsi, l'information chimique relative aux intensités croissantes de moisi des échantillons semble diluée par les composés du liège.

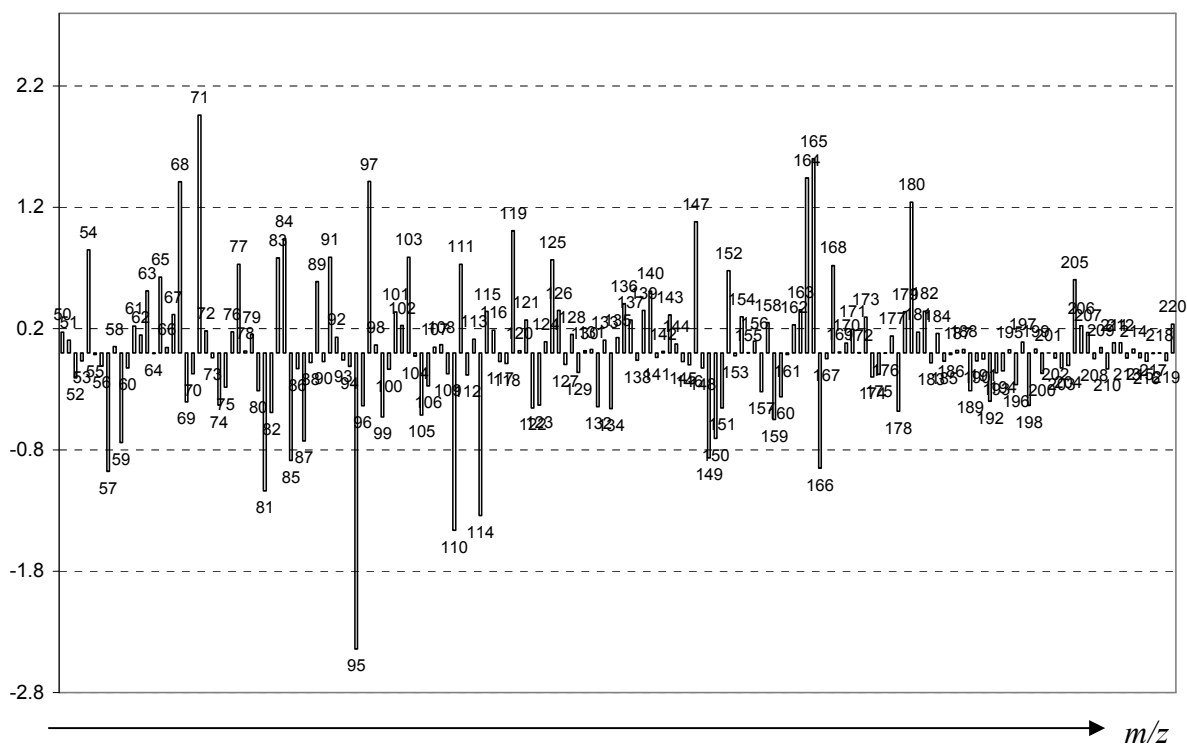


Figure 30. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à X (66 x 171).

Lors de l'étape de validation de la PLS 1 avec X_v (50 x 171) et Y_v (50 x 1), le modèle a mis en évidence une très faible corrélation entre les valeurs à prédire et les valeurs prédites du modèle, avec un coefficient de régression de 0,32 et une SEP élevée de 1,17. La mauvaise qualité de la validation révèle une évolution des empreintes spectrales des échantillons de validation par rapport aux échantillons d'étalonnage. Les causes de cette évolution peuvent provenir de plusieurs facteurs dépendants ou indépendants du DHS-MS. Parmi les facteurs

indépendants liés à l'échantillon étudié, on trouve par exemple un appauvrissement en composés volatils lors du stockage des échantillons. Les facteurs dépendants du DHS-MS liés à l'ionisation des molécules sont par exemple la pollution progressive de la source d'ions du spectromètre de masse ou les différentes opérations de maintenance de l'analyseur de masse.

Ces résultats laissent donc supposer que le modèle n'est pas valide, nous proposons alors de tenter de l'améliorer en étendant la base de données d'étalonnage de la matrice \mathbf{X} par un ajout de 20% des individus de validations. Un modèle de régression PLS est alors appliqué à la matrice ainsi remise à jour.

3.3.2.2.3 Remise à jour du modèle PLS 1

Afin d'améliorer la capacité de prédiction du modèle, la mise à jour permet d'inclure dans le modèle de PLS les facteurs de variabilité qui sont intervenus entre les individus d'étalonnage et les individus de validation. Pour ce faire, nous avons ajouté à la matrice d'étalonnage \mathbf{X} , 10 individus de la matrice de validation \mathbf{X}_v . Les 10 individus utilisés pour la mise à jour, correspondent à deux échantillons de validation prélevés au hasard dans chacun des cinq groupes de mois. Par conséquent, la matrice d'étalonnage mise à jour nommée \mathbf{X}_2 a pour dimension 76 individus et 171 variables. La nouvelle matrice de validation nommée \mathbf{X}_{v_2} a pour dimension 40 individus et 171 variables. Les résultats du nouveau modèle de PLS 1 basé sur \mathbf{X}_2 (76 x 171) et \mathbf{Y}_2 (76 x 1) montrent que la SEC minimum de 0,311 et un coefficient de corrélation élevé de 0,945 a été observée pour un modèle à 10 variables latentes. Le nombre de variables latentes du modèle remis à jour est élevé et il indique un probable sur-apprentissage du modèle ce qui, sans remettre en cause la qualité des résultats, invite à la prudence. La Figure 31 présente la droite de régression entre les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle pour les individus d'étalonnage (a) et pour les individus de validation \mathbf{X}_{v_2} (40 x 171) (b) par le modèle remis à jour. Le modèle présente un bon coefficient de corrélation de 0,958 et il est associé à une faible erreur de prédiction (SEP) de 0,318. Ces résultats indiquent bien que la mise à jour du modèle de prédiction PLS a significativement amélioré la qualité du modèle, en particulier à l'étape de validation du modèle. Les coefficients \mathbf{b} du modèle de PLS 1 sur \mathbf{X}_2 sont présentés dans la Figure 32. L'examen du coefficient \mathbf{b} montre que le modèle a donné plus de poids à certaines variables par comparaison aux coefficients \mathbf{b} du premier modèle de PLS comme c'est le cas par exemple pour le $m/z = 71$ et 192, 198.

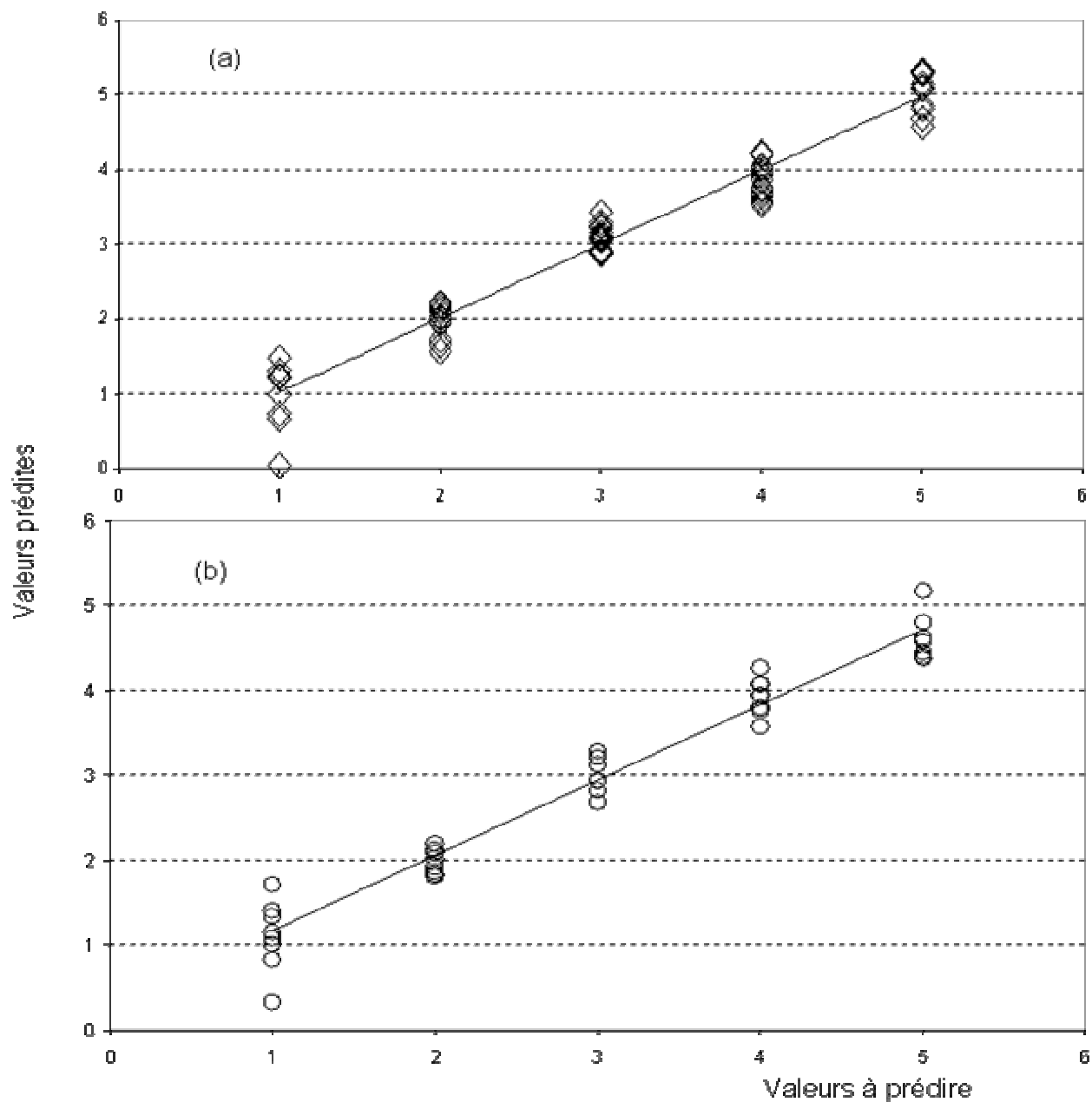


Figure 31. Droite de régression entre les valeurs observées (valeurs à prédire) et les valeurs prédites par le modèle PLS mis à jour pour les échantillons d'étalonnage (a) et de validation (b).

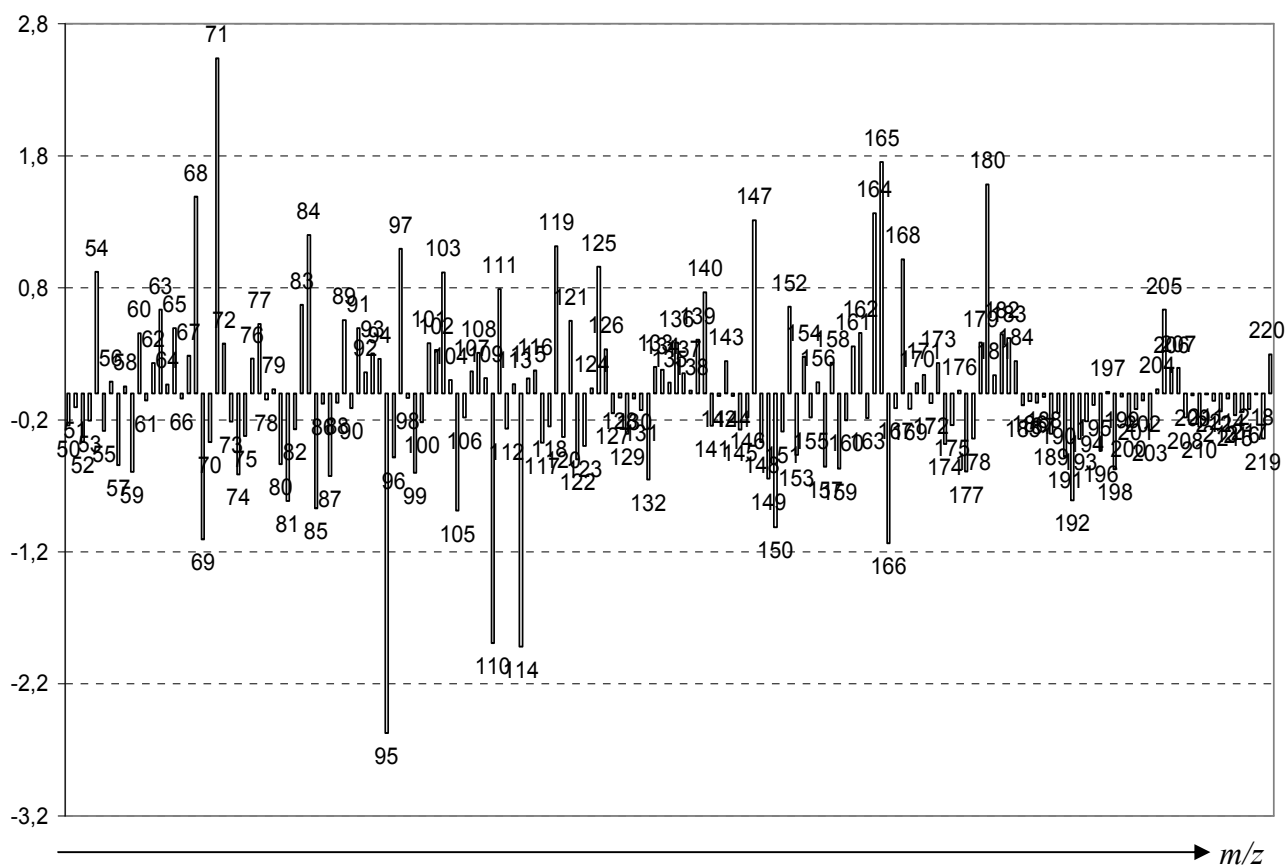


Figure 32. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à X_2 .

Puisque les variables du TCA n'apparaissent pas dans les b coefficients du modèle, nous avons alors tenté bâtir un autre modèle de PLS en ne prenant cette fois en compte que les variables m/z contenues dans le spectre de masse spécifique des chloroanisoles (TCA, TeCA et pentachloroanisole). 72 variables ont ainsi été sélectionnées. Un modèle de régression PLS 1 a alors été conduit sur une matrice X_{ani} (76 x 72) et Y (76 x 1). La droite de calibrage et de validation présentée dans la Figure 33 montre la médiocrité de la validation du modèle puisque les valeurs prédites des échantillons de validation sont soit surestimées comme c'est le cas pour les groupes d'échantillons mois 1 et 2 ou au contraire sous estimées comme c'est le cas pour les groupes d'échantillons mois 3, 4 et 5. Parmi les 72 m/z spécifiques des anisoles, les variables ayant contribué à ce modèle sont indiquées dans la Figure 34.

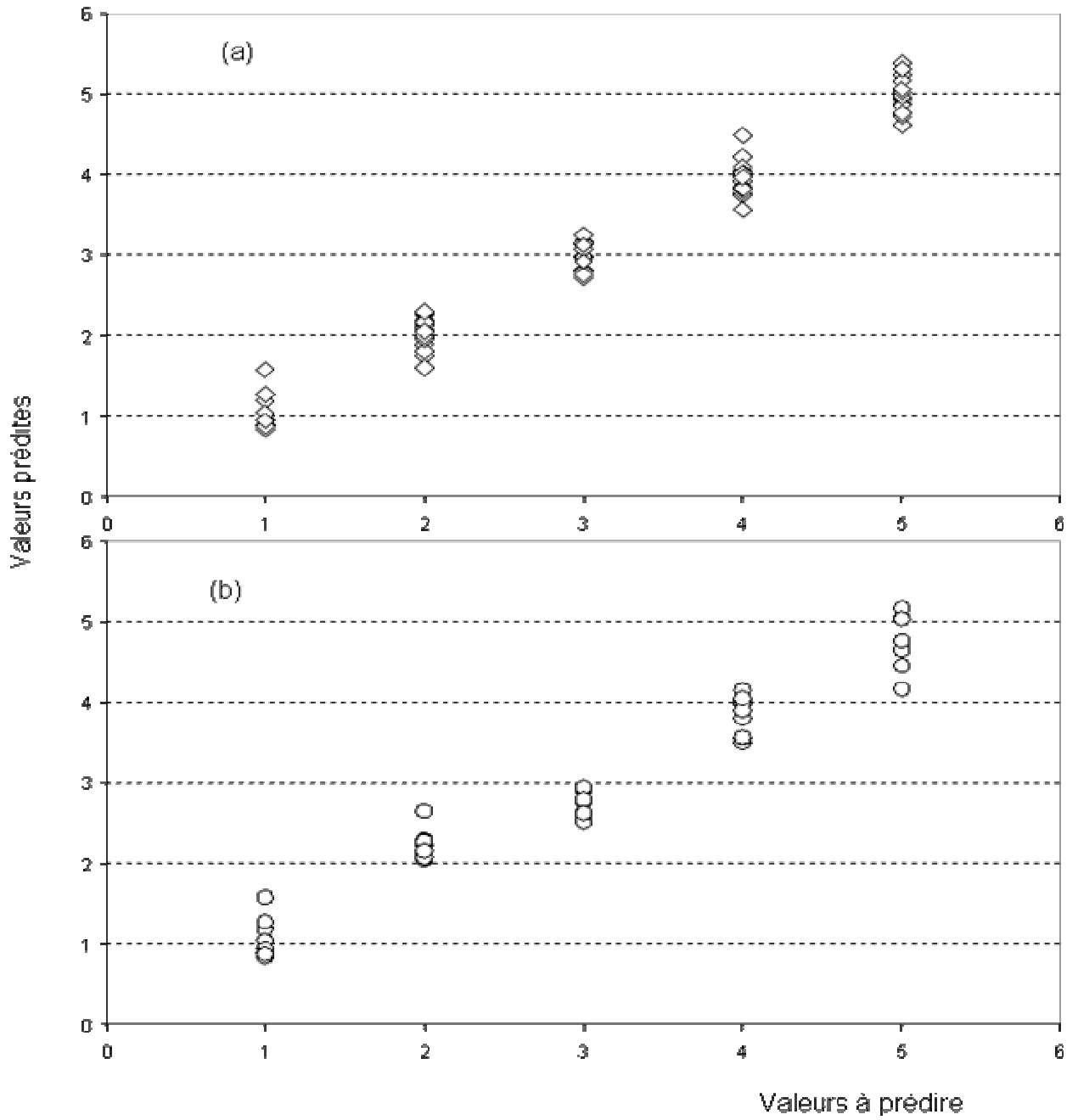


Figure 33. Droite de régression entre les valeurs observées (valeurs à prédire) et les valeurs prédites par le modèle PLS sur la matrice \mathbf{X}_{ani} (76 x 72) et \mathbf{Y} (76 x 1).

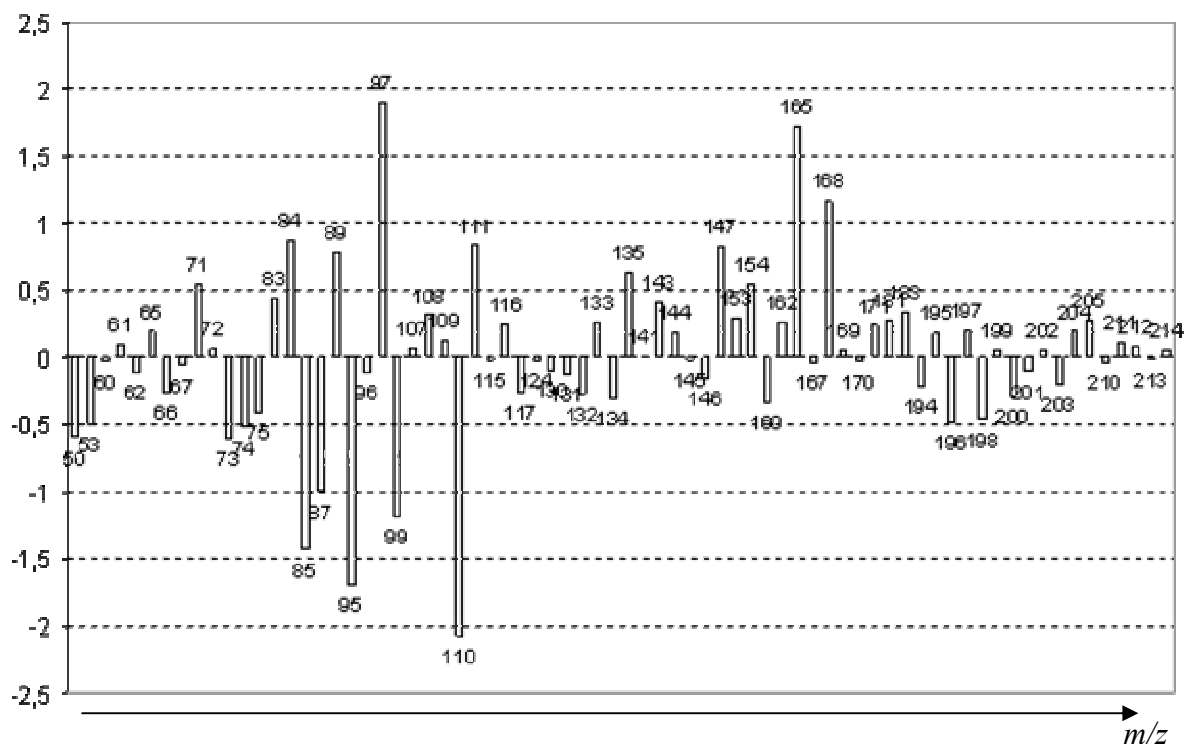


Figure 34. Coefficients b du modèle de PLS 1 appliquée à X_{ani} .

3.3.2.3 Conclusion

Le couplage espace de tête dynamique - spectromètre de masse (DHS-MS) en jonction avec des méthodes d'analyses multivariées s'est avéré être une approche efficace pour la caractérisation rapide de la qualité des échantillons présentant différentes intensités de défauts olfactifs de moisi. Néanmoins, l'information chimique spécifique de l'odeur de moisi est masquée par les spectres de masses des composés du liège ou par ceux de sa dégradation, présents en grande quantité dans l'espace de tête du DHS-MS. Par ailleurs, les empreintes spectrales des échantillons analysés à des périodes différentes peuvent contenir une source de variabilité entraînant une baisse du pouvoir prédictif du modèle de PLS employé. Une remise à jour du modèle offre alors une solution efficace à ce problème.

3.3.3 Discussion générale sur ces études de caractérisation par DHS-MS

La technique des capteurs ioniques associé aux analyses multivariées apparaît comme étant prometteuse car elle nous a permis d'effectuer des mesures relativement rapides de la fraction volatile globale des échantillons et, à ce jour, elle n'a encore jamais été appliquée à la caractérisation de l'origine géographique des rondelles du liège oenologique.

Dans cette étude, le modèle employé pour discriminer et prédire les réponses des échantillons de liège analysés par DHS-MS a permis de les classer et de les prédire correctement selon leur origine et leur qualité de défaut. Ces résultats suggèrent que la technique des capteurs ioniques, associée aux méthodes de traitement de données telles que l'ACP et la PLS, est applicable à des mesures visant par exemple à contrôler, dans un objectif industriel, la matière première (les planches brutes du liège) ou les produits finis (bouchons de liège), voire de prédire leur caractéristiques aromatiques dans l'objectif d'en certifier l'origine.

Notre approche a d'ailleurs séduit un industriel du bouchon, lors de la présentation de nos travaux dans une publication.

3.3.3.1 Originalités de ce travail

L'étude menée au cours de ce travail sur la caractérisation d'échantillons de liège œnologique par DHS-MS est originale par son approche, sur bien des aspects.

En premier lieu, la caractérisation du liège selon son habitat n'avait jamais été menée en utilisant un quelconque type de nez électronique ;

D'autre part et s'agissant de l'étude des défauts de moisi, en dépit du fait qu'un capteur ionique ait déjà été employé dans le but de différencier un groupe d'échantillon de liège sain d'un second groupe de moisi (Nitz, 2000), nous avons, au cours de nos travaux, étendu l'application à un plus grand nombre d'individus et de groupes d'individus. De plus, l'analyse a été menée sur une échelle de temps de plusieurs mois d'intervalle pour tester la stabilité du capteur ionique. En outre, nous avons tenté de mettre en relation, grâce à une PLS, des données sensorielles quantifiées avec des données instrumentales du DHS-MS, afin de vérifier si les empreintes spectrales des produits suivent la même tendance que leur déviation olfactive. Cela s'est révélé être le cas pour l'ensemble des intensités prédites par le modèle ; la discrimination est cependant moins nette entre les intensités de moisissures intermédiaires.

En ce qui concerne l'exploitation des données obtenues par capteurs ioniques, la PLS a été très peu employée jusqu'ici si l'on s'en réfère à la littérature scientifique. De plus, dans bien des applications, aucune validation n'est réalisée pour tester la base de données composée des signatures spectrales des produits ou bien seule une validation interne est effectuée. Ainsi par exemple, Saevels (Saevels *et al.*, 2004) a tenté de bâtir un modèle de PLS pour différencier des échantillons de pommes selon leur durée de conservation, avec une validation du modèle réalisée par validation croisée interne (« leave one out »). Or la validation par un jeu de données externes telle que nous l'avons réalisée dans ce travail permet un meilleur test du pouvoir prédictif du modèle.

3.3.3.2 Limites de ces études et perspectives à ce travail

Nos résultats ont montré que la base des données d'apprentissage du DHS-MS (pour les deux études de caractérisation menées) ne permet pas une modélisation définitive à cause du nombre limité des échantillons fournis. Il serait donc nécessaire d'élargir la base d'apprentissage des modèles et de les étendre à plus de catégories d'échantillons pour augmenter la robustesse du modèle.

Par ailleurs, il est également apparu que l'interprétation des empreintes par la recherche des ions spécifiques est très délicate et que les résultats doivent être considérés avec circonspection. En effet, si l'empreinte spectrale globale est spécifique, les ions m/z dont elle est constituée ne le sont pas nécessairement. Ainsi, nous avons pu constater que, si certains d'entre eux sont caractéristiques d'activités métaboliques, de structure chimiques et même de composés précis du mélange (cas de la vanilline), d'autres ions sont a priori non spécifiques et susceptibles de masquer ou noyer la présence des ions spécifiques. Pour améliorer la spécificité des fragments, on pourrait utiliser un autre mode de fragmentation des molécules : par exemple en faisant varier l'énergie d'ionisation par impact électronique comme cela a été expérimenté par Begnaud (Begnaud *et al.*, 2002).

3.3.4 Conclusion sur le pouvoir discriminant du système DHS-MS

Les résultats obtenus dans ce travail avec le système DHS-MS sont encourageants, puisque son pouvoir discriminant a pu être mis en évidence, que ce soit pour des échantillons de liège d'origines géographiques différentes, ou pour des échantillons de liège de qualités variables. Par contre, l'absence de séparation des composés volatils obtenus après extraction par espace de tête, conduit à une empreinte spectrale complexe. L'utilisation de méthodes statistiques multivariées est donc un outil incontournable pour exploiter ce type de données.

Malgré son potentiel, le système que nous avons utilisé reste un prototype de laboratoire, difficilement automatisable et dont certains paramètres n'ont pas pu être optimisés. Il présente donc ses limites et c'est pourquoi la seconde partie de notre étude a porté sur l'étude de la microextraction en phase solide comme système d'extraction pour un nez électronique à capteurs ioniques. Ceci est donc le sujet du chapitre qui suit.

4 –Nez électronique à capteurs ioniques basé sur une extraction par microextraction en phase solide

Cette partie expose les travaux concernant la mise en œuvre et l'application d'un nez électronique basé sur le couplage microextraction en phase solide – spectromètre de masse (SPME-MS). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un contrat industriel établi avec la société Sabaté dont l'activité s'articule autour du le bouchage du vin. Notre collaboration avec Sabaté répondait au souhait de disposer d'une méthode pour l'authentification du liège dans le cadre par exemple d'une approche « origine contrôlée ».

A la suite des résultats obtenus par espace de tête dynamique couplé à la spectrométrie de masse (DHS-MS), nous avons proposé de modifier notre précédente méthode pour utiliser, cette fois, la microextraction en phase solide (SPME) couplée à la spectrométrie de masse. Malgré le risque de sensibilité réduite, deux raisons ont motivé cette évolution : d'une part, la simplicité de mise en œuvre de l'appareillage de SPME et, d'autre part son efficacité avérée en tant que système de nez électronique à spectrométrie de masse. A ce sujet, nous pouvons citer les travaux de Marsili (Marsili, 2000) qui présente un exemple d'application réussie d'un couplage SPME-MS pour différencier les mauvais arômes d'échantillons de lait ayant subi différents types de traitements (lumière, cuivre, chaleur et contamination microbienne) ainsi que les travaux de Pérès (Pérès *et al.*, 2002a) présentant une application réussie de la SPME-MS pour la caractérisation de cinq camemberts selon leur type et leur degré d'affinage. De plus, la SPME présente les avantages d'offrir une large gamme de phases de piégeage et d'être automatisable (via un système CTC Combipal).

Le tandem SPME-MS a donc été appliqué à la râpuration de planches de liège brutes dans le but d'établir des "modèles" selon les origines géographiques. En appliquant la méthode au liège cru, on peut espérer avoir accès au plus grand nombre d'espèces chimiques constituant la signature spectrale du liège. Il demeure le risque que les constituants ôtés au bouillage ne soient pas informatifs et que, au contraire, leur présence augmente le bruit de fond de la méthode.

Comme pour le système DHS-MS, nous avons procédé en deux étapes, avec une mise au point préliminaire, suivie d'une évaluation du potentiel discriminant des empreintes obtenues par SPME-MS sur des échantillons de liège oenologique. Avant de présenter les résultats obtenus, nous allons présenter les matériels et méthodes mis en œuvre dans cette étude.

4.1 Matériels et méthodes

Après une présentation de l'origine des échantillons de liège et de la préparation qu'ils ont subi, nous allons préciser dans cette partie les appareillages utilisés. Les méthodes statistiques ne seront, quant à elles, pas détaillées, puisque nous avons utilisé les mêmes que pour l'étude du DHS-MS. Le tandem SPME-MS a été appliqué à la râpure de planches de liège brutes en vue d'établir des modèles de prédiction de l'origine géographique.

Le principe de l'extraction par SPME repose sur l'équilibre qui tend à s'établir entre deux phases, la phase gazeuse (espace de tête de l'échantillon) et la phase stationnaire (fibre). Les facteurs influençant cet échange sont la température et la durée d'exposition de la fibre. La quantité extraite dépend de la nature de la phase et de son épaisseur. La mise au point de la SPME concernera donc ces trois facteurs.

Comme lors de l'étude du DHS-MS, la SPME-GC-MS a été utilisée dans l'étape de mise au point de la méthode. La SPME-GC-MS a été employée dans cette étude afin de caractériser la nature des composés volatils retenus par chacune des fibres et également de guider le choix de la nature de la fibre à employer dans l'étude discriminante ainsi que la durée d'exposition de la fibre dans l'espace de tête de l'échantillon. Le choix de ces facteurs s'est fondé sur la répétabilité du signal, évaluée par le coefficient de variation.

4.1.1 Origine et préparation des échantillons

Les échantillons ont été fournis par la société Sabaté. Ce sont des planches de liège brute non éventrées et non écorcées. Elles proviennent des origines géographiques suivantes : Maroc (3 régions du Maroc), Portugal (2 régions du Portugal), et Espagne (3 régions d'Espagne). Leur effectif est présenté dans le Tableau 11 suivant. Le nombre de répétitions réalisées pour chaque origine a varié en fonction de la taille des lots de liège fournis.

Tableau 11. Origine et effectif des échantillons.

Origine	Régions	Nombre de planches	Nombre de répétitions
Maroc	Dhar Daman (intérieur des terres) El Menzeh (Atlantique) Sidiahsine Ras Beriakh (intérieur des terres)	3 planches / région	6 répétitions / planche

Espagne	Malaga (méditerranée)	10 planches / région	2 répétitions / planche
	Cadiz (Atlantique)		
	Caceres (intérieur des terres)		
Portugal	Ponte do sor (intérieur des terres)	10 planches / région	2 répétitions / planche
	Alcochete site 1 (Atlantique)	5 planches / région	
	Alcochete site 2 (Atlantique)	5 planches / région	

Leur préparation a consisté en une pulvérisation à l'aide d'un système de râpage motorisée. La partie ventrale de la planche a été éliminée par râpage pour accéder à la partie d'intérêt située au centre (le liège brut). Le pulvérisât du liège brut, obtenu par râpage mécanique, a été homogénéisé puis stocké dans du papier aluminium. Avant analyse, 1 g d'échantillon de liège a été pesé puis mis dans un flacon de SPME. Les dimensions des flacons employés sont de 87 mm de hauteur, de 32 mm de diamètre de col et de 40 mL de volume.

4.1.2 Le SPME-MS : appareillage

Le principe général de la caractérisation rapide par SPME-MS ayant déjà été précisé dans la partie bibliographique, nous allons à présent détailler les différents éléments de l'appareillage utilisé ci-dessous.

4.1.2.1 Le support de fibre

Le support de fibre (seringue) utilisé est de marque SUPELCO. L'extrémité métallique de la seringue contient la fibre de SPME à l'intérieur de laquelle elle est rétractée. Pour la mise en contact de la fibre avec l'espace de tête de l'échantillon, l'extrémité métallique de la seringue vient percer le septum du flacon contenant l'échantillon. La fibre est ensuite exposée par son déploiement dans l'espace de tête de l'échantillon.

4.1.2.2 Le bain de sable

La chauffe de l'échantillon pour extraire sa fraction volatile s'est réalisée à l'aide d'un bain de sable dans lequel était placé le flacon contenant l'échantillon.

4.1.2.3 Les fibres de SPME employées

Les performances de deux fibres SPME ont été testées :

- ♦ Fibre revêtue d'un film polymérique de polydiméthylsiloxane (PDMS) d'une épaisseur de 100µm (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, USA).
- ♦ Fibre revêtue d'un film de Carboxen-PDMS d'une épaisseur de phase de 75 µm (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, USA).

4.1.2.4 L'injecteur

La désorption des molécules piégées dans la fibre de SPME s'est réalisée en plaçant la fibre dans l'injecteur d'un chromatographe Trace GC 2000 1.4 SR1. (Thermo Finnigan). Le mode d'injection employé était une « vaporisation » programmable en température, sans division de flux dans l'injecteur (PTV *splitless*). Ce mode d'injection est le plus couramment employé car il permet de compenser le volume de piégeage offert par la SPME (Vas *et al.*, 2004).

La programmation de température de l'injecteur a été la suivante : 45°C pour l'injection proprement dite, puis la température augmente à raison de 10°C/s jusqu'à 250°C durant 10 minutes. Le débit d'hélium était de 2 mL/min. L'usage d'un insert d'un diamètre de 1 mm de diamètre a permis l'introduction rapide et globale des composés désorbés dans la colonne car il augmente la vitesse linéaire du gaz vecteur par rapport à un insert traditionnel de 2 mm de diamètre interne.

4.1.2.5 La ligne de transfert

La ligne de transfert était une de silice fondue désactivée (SUPELCO), d'un diamètre interne de 0,1 mm, et d'une longueur de 1m. Elle a été maintenue à 200°C.

4.1.2.6 Le spectromètre de masse

Le détecteur employé dans cette étude était un spectromètre de masse à trappe d'ions, de marque Finnigan Polaris (Thermo Quest). L'intervalle de masse considéré s'étendait de 50 à 233 uma. L'ionisation s'est effectuée par impact électronique à 70 eV. La pompe turbomoléculaire aspire à une vitesse de 250 L/s.

4.1.3 Le SPME-GC-MS : appareillage

Afin de mieux se rapprocher des conditions de SPME-MS cités précédemment, l'appareillage employé ainsi que les paramètres d'acquisitions de la SPME-GC-MS sont identiques à ceux mis en œuvre en SPME-MS à deux exceptions près : la longueur de la colonne chromatographique (30 m au lieu de 1 m) et le débit d'hélium qui est, dans le cas de la SPME-GC-MS, de 1 mL/min au lieu de 2 mL/min.

4.2 Analyse préliminaire par SPME-GC-MS

Après une présentation de la méthode suivie pour le choix de la nature de la fibre de SPME à employer ainsi que sa durée d'exposition, nous allons présenter dans ce paragraphe les résultats d'une tentative d'identification de la nature des composés retenus par la fibre choisie. Lors des essais par SPME-GC-MS, la température de l'échantillon a initialement été choisie à 100°C pour favoriser le passage des composés volatils et semi-volatils du liège de la phase solide à la phase gazeuse. Les échantillons utilisés pour les essais préliminaires étaient d'origines marocaines de la région de Dhar Daman.

4.2.1 Choix de la nature de la fibre

Les capacités de rétention de deux fibres ont été testées : la fibre de PDMS et la fibre Carboxen-PDMS. La comparaison de leurs propriétés de rétention s'est effectuée sur une configuration SPME-GC-MS en exposant la fibre pendant 15 minutes pour une température de l'échantillon de 100°C. Trois répétitions ont été réalisées pour chacune des fibres. Les moyennes des pics chromatographiques ainsi que leurs écarts types sont présentées dans la Figure 35.

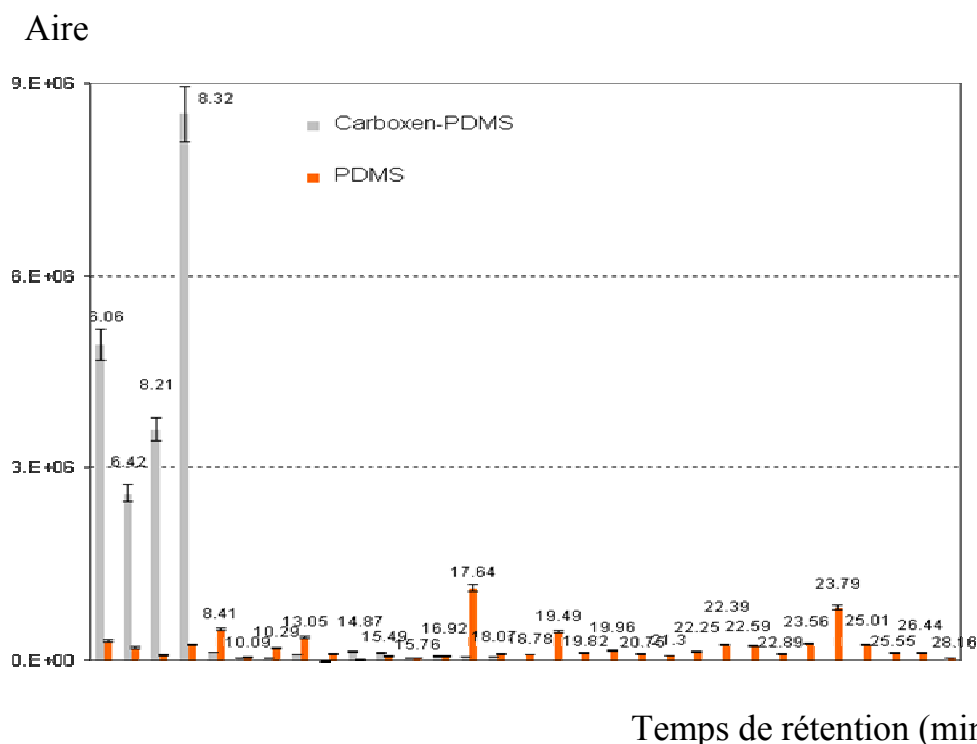


Figure 35. Moyenne et écart type des pics chromatographiques obtenus pour les deux fibres testées.

Les chromatogrammes montrent que la fibre de Carboxen-PDMS est plus spécifique des composés de faible poids moléculaire, alors que la fibre PDMS présente un profil chromatographique plus riche et plus varié en composés volatils (29 pics obtenus avec le PDMS contre 10 pics avec le Carboxen-PDMS).

En effet, la fibre de Carboxen-PDMS est connue pour être plus adaptée à l'extraction des petites molécules en raison de la taille des micropores de la phase (Pillonel *et al.*, 2002b). Les résultats que nous avons obtenus sont également en accord avec ceux de Shirey (Shirey, 2000) qui a montré, dans une étude où il a comparé 6 fibres de SPME sur un mélange étalon composé de 15 molécules volatils et semi-volatils représentant 13 classes de familles chimiques, que les intensités des pics extraits par Carboxen-PDMS étaient plus de 200 fois supérieures de ceux extraits par PDMS. Cependant, dans le cadre d'une étude de discrimination comme celle que nous conduisons, ce qui nous intéresse est la richesse du signal plus encore que son intensité. Avec des signaux plus riches en espèces ioniques, nous augmentons la probabilité de dépister d'éventuelles sources de variabilités présentes dans les données. C'est pourquoi, le choix du PDMS s'est avéré plus judicieux. De plus la fibre de PDMS est celle qui a été employée par Sabaté pour le dosage en routine du TCA à partir de macérât de bouchons (selon le protocole opératoire de Sabaté). Nous avons donc opté pour le PDMS pour la suite de l'étude.

4.2.2 Choix de la durée d'exposition de la fibre

Une cinétique d'exposition de la fibre de PDMS a été effectuée pour trois durées d'exposition : 5, 10 et 15 minutes sur une configuration SPME-GC-MS, avec les conditions expérimentales suivantes : température de l'échantillon de 100 °C. Ces analyses ont été répétées trois fois. La moyenne et l'écart type des pics chromatographiques pour chaque temps d'exposition étudié sont représentées dans la Figure 36. Elle montre qu'il existe une relation entre le temps d'exposition de la fibre et la quantité de composés volatils absorbés. Pour répondre à notre objectif de rapidité et d'intensité du signal, la durée de 10 minutes d'exposition a été choisie.

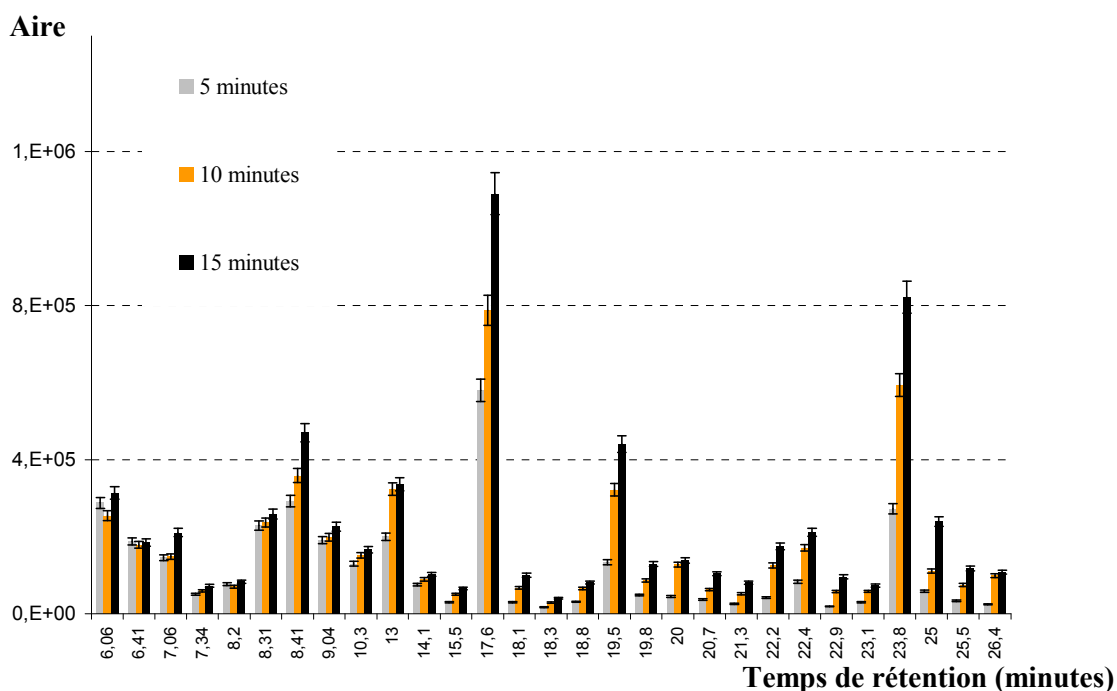


Figure 36. Chromatogramme moyen et écart type des trois répétitions effectuées pour chacune des durées d'exposition de la fibre de PDMS suivantes : 5, 10 et 15 minutes d'exposition.

4.2.3 Tentative d'identification par SPME-GC-MS des composés volatils du liège

Une tentative d'identification des volatils de la râpure de planches de liège a été menée à partir du chromatogramme présenté dans la Figure 37, en comparant les spectres de masses et le temps rétention des 29 pics obtenus par SPME-GC-MS à une bibliothèque de spectres de masse NIST (National Institute of Standards and Technology) comportant 137601 spectres.

Il s'agit du chromatogramme d'un échantillon de liège dont les composés volatils et semi-volatils ont été extraits à une température de 100°C durant 10 minutes d'exposition de la fibre. Le Tableau 12 présente le temps de rétention ainsi que la famille chimique probable de 21 pics parmi les 29 pics séparés. La famille chimique des pics restants n'a pas pu être interprétée en raison des faibles pourcentages de corrélation avec les spectres de la base de données. Les ions majoritaires sont les ions 91, 93 et 204, spécifiques des terpènes, particulièrement des monoterpènes et des sesquiterpènes. Les spectres de masses des pics consignés dans le tableau 12 sont présentés en annexe 3.

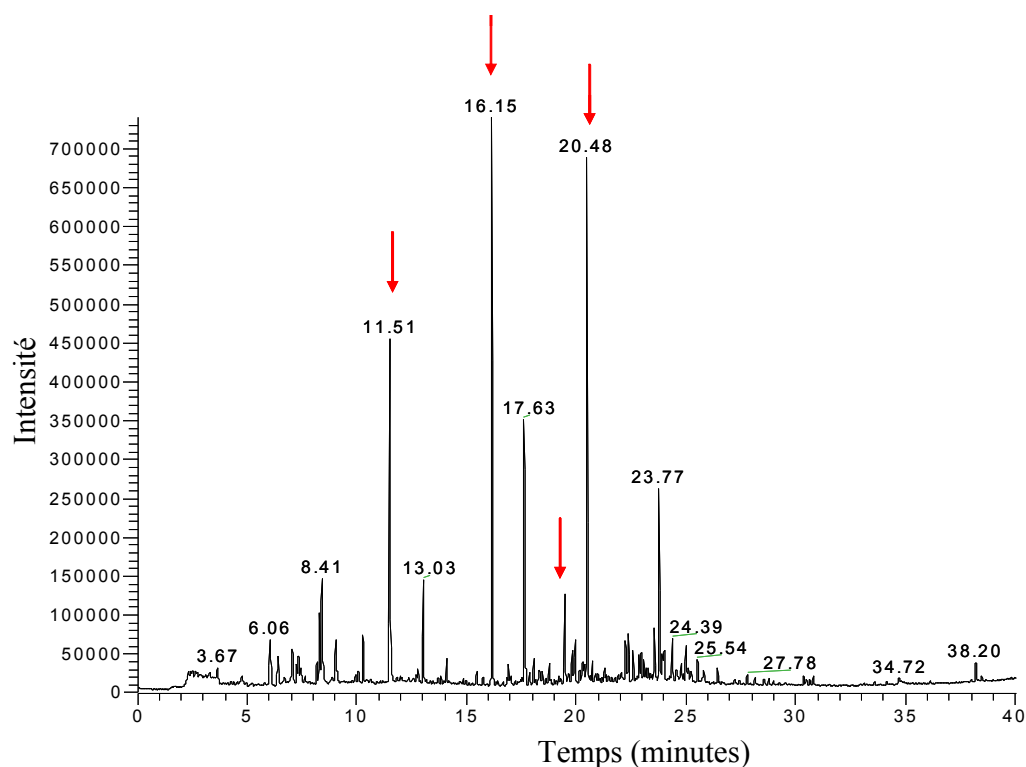


Figure 37. Chromatogramme d'un échantillon de planche de liège obtenu avec une fibre de PDMS et par SPME-GC-MS. Les flèches rouges indiquent les pics de polysiloxanes de la fibre.

Tableau 12. Tentative d'identification des composés volatils et semi-volatils du liège par SPME-GC-MS

Pic	Temps de rétention (min)	Famille chimique
1	6,06	monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆)
2	06,714	monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆)
3	7,06	monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆)
4	7,34	2-pentylfuran (C ₉ H ₁₄ O)
5	8,2	monoterpènes C ₁₀ H ₁₆
6	8,41	alcool terpénique (C ₁₀ H ₁₈ O)
7	10,28	alcyne (C ₁₀ H ₁₈)
8	13,03	alcyne (C ₁₁ H ₂₀) ou alcool (C ₁₀ H ₂₀ O)
9	14,09	methoxy-4methyl-1-[methylethyl]-2- benzène (C ₁₁ H ₁₆ O)
10	15,48	alcool (C ₁₂ H ₂₆ O)
11	17,63	sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₄)
12	18,77	sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₄)
13	19,81	sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₄)

14	19,95	phenols (C ₁₅ H ₂₄ O)
15	20,73	sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₄)
16	21,29	alcool terpénique (C ₁₅ H ₂₄ O)
17	22,24	acide (C ₁₂ H ₁₈ O ₂)
18	22,88	alcanes
19	23,08	alcènes
20	25	alcools
21	25,54	alcools

4.3 Mise au point du tandem SPME – MS

Pour la mise au point en SPME-MS, le dernier facteur influençant l'extraction qui reste à déterminer est la température de l'échantillon, le temps d'exposition de 10 minutes et la nature de la fibre de (SPME) étant préalablement choisis par SPME-GC-MS. Le choix de ce facteur a été établi par SPME-MS. Le signal du tandem SPME-MS se présente sous la forme d'un pic asymétrique (courant ionique total ou pic de désorption) de 2 minutes de large (Figure 38).

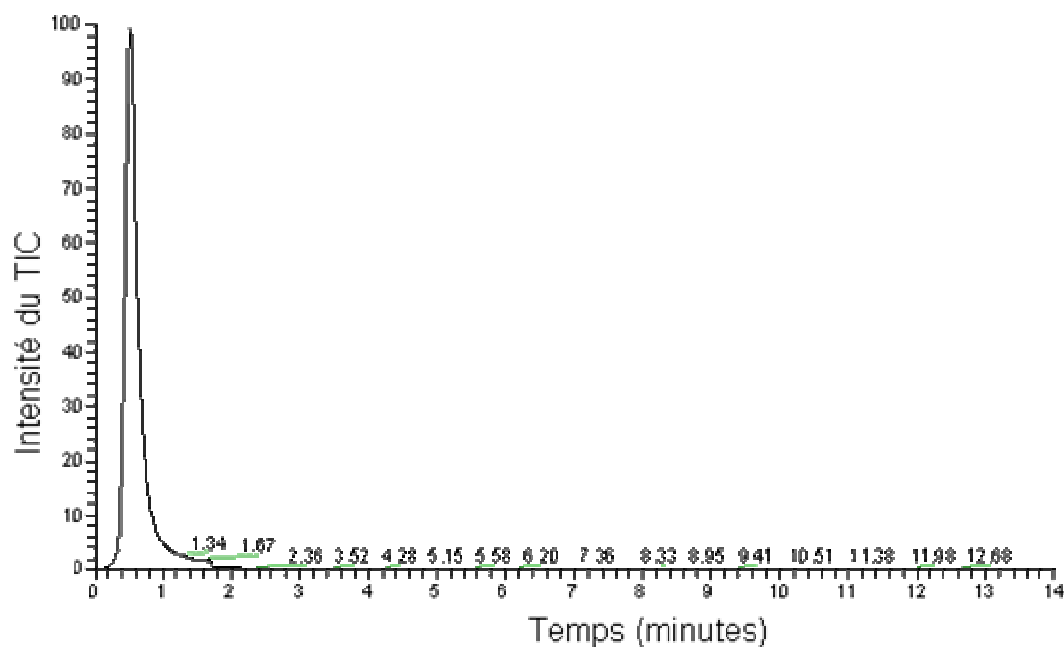


Figure 38. Courant ionique total (TIC) d'un échantillon de liège espagnol (région de Cadiz) dans la configuration du nez électronique à capteurs ioniques (SPME-MS).

4.3.1 Choix de la température de l'échantillon

Pour cette étude nous avons fait varier la température de l'échantillon avec les valeurs de 50, 70, 100, 120 et 140°C (température maximale du bain de sable). Trois répétitions ont été réalisées pour chacune des températures citées. Sur la Figure 39 sont représentés la moyenne des aires des pics de désorption et l'écart type, calculés pour chaque température. Les résultats montrent que la température pour laquelle le coefficient de variation est le plus bas (Tableau 13) est 120°C. Cette température a donc été retenue pour la suite de l'étude.

Moyenne des aires

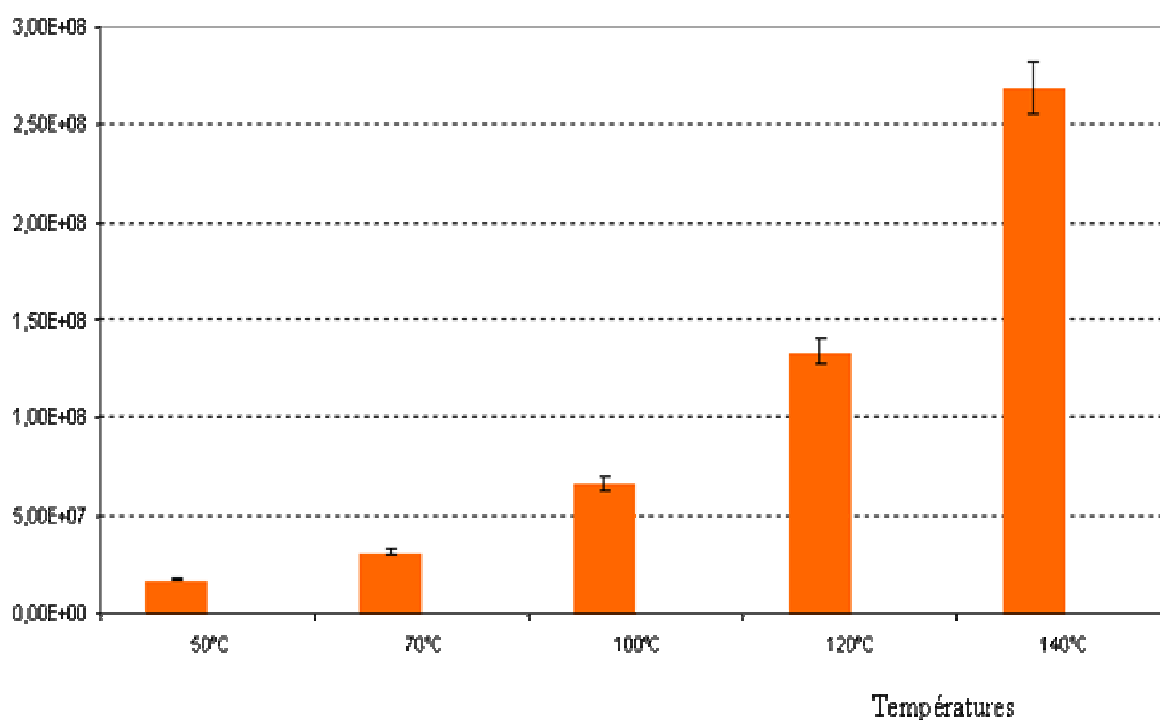


Figure 39. Moyenne des aires obtenues par SPME-MS et leurs écarts types respectifs pour chacune des températures de l'échantillon étudiées.

Tableau 13. Moyenne, écart type et coefficient de variation des aires des pics en fonction de la température de l'échantillon en mode SPME-MS.

Températures (°C)	50	70	100	120	140
Moyenne	17375005,74	31231621,22	66363550,07	133419893,6	268269629,3
Ecart type	1336623,93	2149547,18	3414148,063	2604787,65	30667747,15
CV	0,077	0,069	0,051	0,020	0,114

4.3.2 Conclusion

Cette partie a exposé les principales étapes de mise au point du couplage microextraction en phase solide – spectromètre de masse (nez électronique à capteurs ioniques). Les conditions expérimentales pour lesquelles nous avons obtenu un signal répétable et reproductible sont résumées dans le Tableau 14 suivant.

Tableau 14. Les paramètres expérimentaux de la SPME-MS à l'issue de l'étude de mise au point de la méthode.

Paramètre mis au point	Condition expérimentale
Nature de la phase recouvrant la fibre	PDMS
Température d'extraction (de l'échantillon)	120°C
Durée d'exposition de la fibre de PDMS	10 minutes

Ces conditions expérimentales ont donc été retenues pour la seconde partie de notre étude du nez électronique basé sur un couplage SPME-MS, qui concerne l'application du système à différents échantillons de liège oenologique afin d'évaluer le pouvoir discriminant de cette technique.

4.4 Evaluation du potentiel discriminant des empreintes obtenues par SPME-MS

Après l'étape de mise au point des paramètres régissant les analyses par SPME-MS, le pouvoir discriminant des empreintes a été éprouvé en établissant un lien mathématique (un modèle) entre les signaux instrumentaux et les caractéristiques des produits analysés.

4.4.1 Les données de SPME-MS

L'intervalle de masse des empreintes spectrales acquises par SPME-MS était de 50 à 232 unités de masse atomique (183 fragments) auxquels ont été soustrait les ions de la phase de piégeage (PDMS) suivants : $m/z = 55, 57, 67, 73, 79, 100, 109, 191, 193, 205, 207$ et 221 uma. Ainsi, l'empreinte spectrale (Figure 40) qui est exploitée ne contenait plus que 171 fragments (variables). Comme mentionné précédemment dans la partie « Matériels et méthodes » de ce chapitre, le nombre de planches par région, et de fait le nombre de répétitions effectuées par planche, a varié selon l'origine géographique des échantillons (Tableau 11).

Ainsi 54 empreintes spectrales ont été acquises par SPME-MS pour les échantillons d'origine marocaine, 60 empreintes pour les échantillons d'origine espagnole et 40 empreintes spectrales pour les échantillons d'origine portugaise. Les empreintes spectrales ont été superposées par ligne dans une matrice **X** constituée donc de 154 individus (toutes origines confondues) et de 171 variables (m/z) en vue d'en extraire l'information au moyen des analyses statistiques décrites dans le paragraphe suivant.

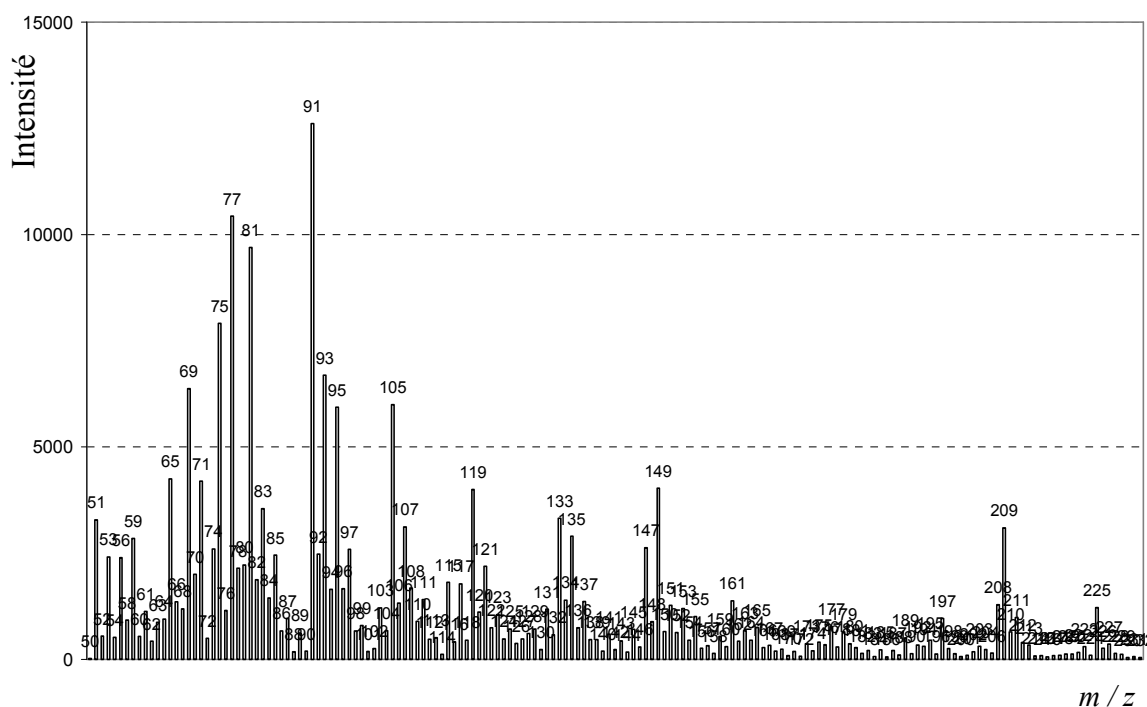


Figure 40. Empreinte spectrale d'un échantillon de liège d'origine marocaine de la région de Dhar Daman constituée de 171 fragments de masse.

4.4.2 L'analyse de ces données

4.4.2.1 Prétraitement des données

La matrice a d'abord été prétraitée en divisant chaque fragment des colonnes par son écart type. Cette opération nous a permis de réduire l'effet de la variation de l'intensité des pics.

4.4.2.2 Les résultats de l'Analyse en Composantes Principales

L'Analyse en Composantes Principales a été appliquée à la matrice **X** réduite par colonne. La Figure 41 montre les coordonnées factorielles des individus de **X** sur PC1 et PC2. Ces

derniers contiennent collectivement 54, 23 % de la variabilité présente dans les échantillons. La figure montre clairement que PC2 sépare les individus marocains des individus ibériques. En revanche les individus portugais et espagnols sont très proches. Les planches du Portugal étaient de deux épaisseurs : planches épaisses (dites bouchonnables) et planches minces. Les planches marocaines et espagnoles étant toutes des planches minces, nous avons donc décidé d'écartier les planches épaisses afin de minimiser la variabilité due aux échantillons. A la matrice \mathbf{X} (154 x 166) on a donc ôté 20 individus de liège épais d'origine portugaise. La matrice de liège mince nommée $\mathbf{X}_{\text{mince}}$ (134 x 171) a été soumise à une ACP.

La Figure 42 présente la projection bidimensionnelle de l'ACP des individus de $\mathbf{X}_{\text{mince}}$ sur PC1 et PC2 avec 56,73% d'inertie. Manifestement, les échantillons de la péninsule ibériques semblent présenter des profils volatils très proches. Néanmoins, les profils volatils des individus du continent africains semblent mieux se différencier de ceux de la péninsule ibérique que lors de l'analyse de \mathbf{X} .

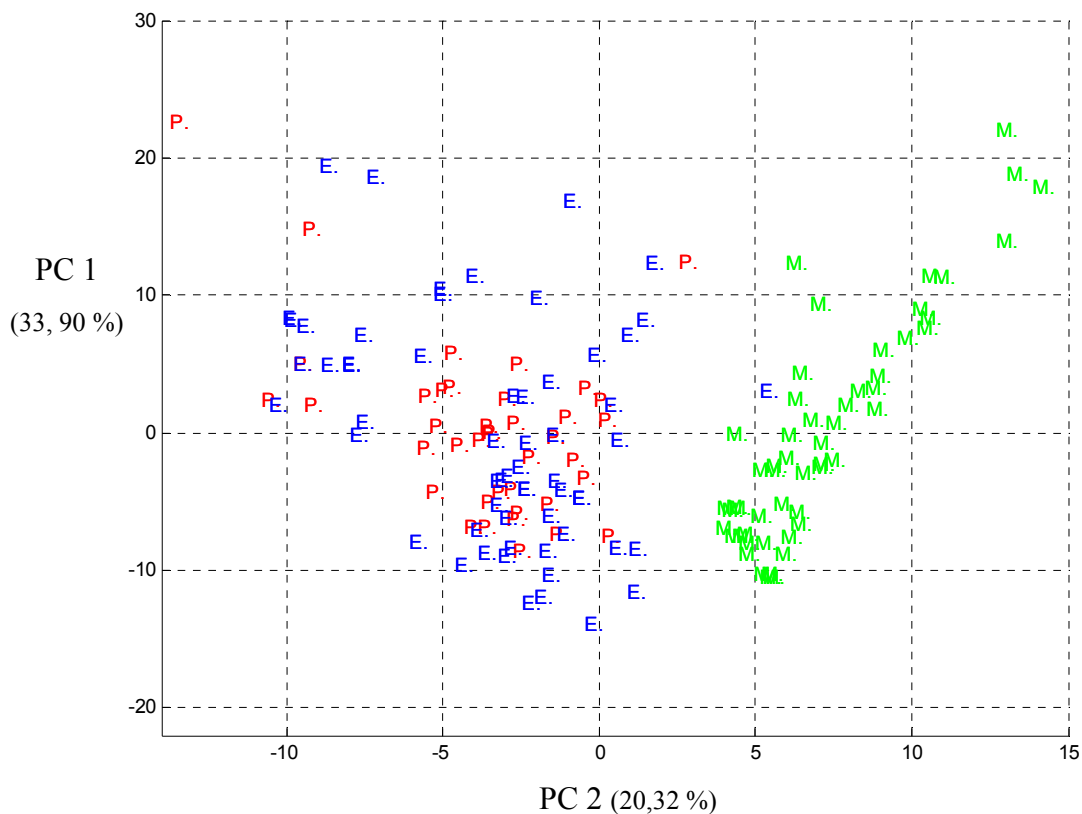


Figure 41. Projection des individus sur PC1 (33,90 %) et PC2 (20,23 %) de l'ACP appliquée à la matrice \mathbf{X} (154 x 171).

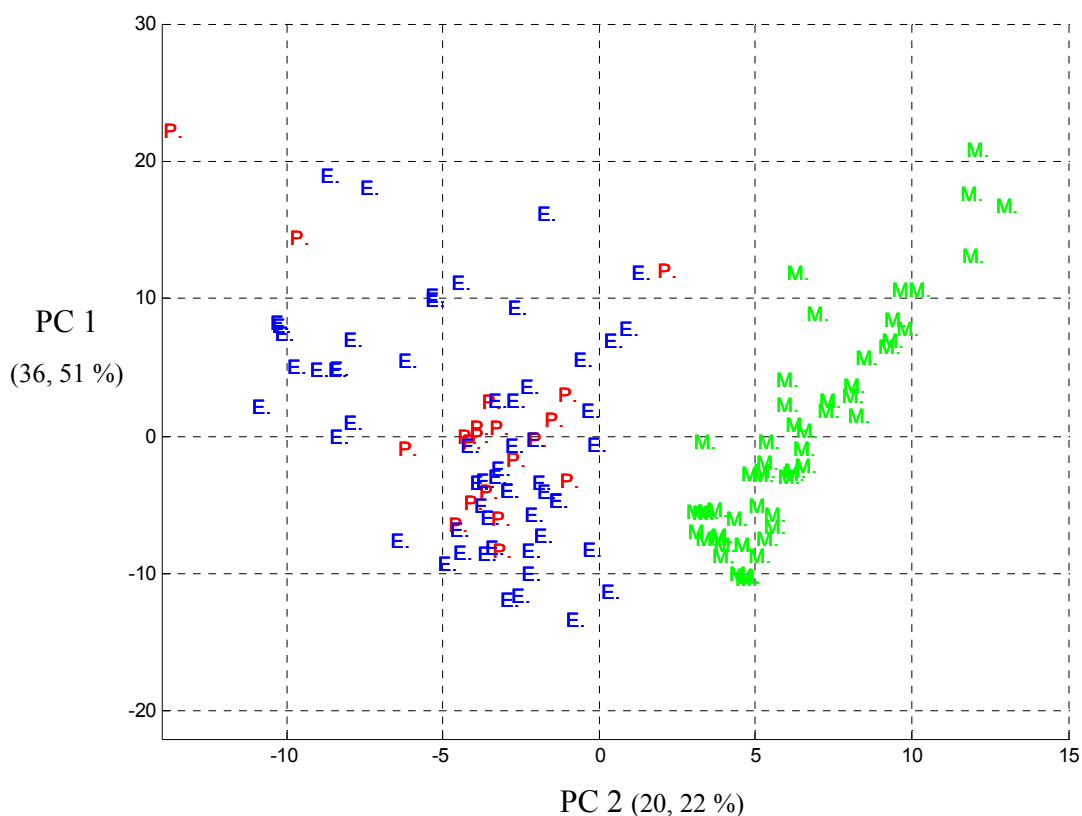


Figure 42. Projection des individus sur PC1 et PC4 de l'ACP appliquée à la matrice X_{mince} (134 x 171).

La projection de l'ACP révèle une grande dispersion des individus d'origine espagnole et portugaise bien que les points correspondant aux répétitions soient proches. Nous pouvons conclure qu'en moyenne, les différences entre les planches d'une région donnée (du Portugal et d'Espagne) sont supérieures aux différences entre régions. Si, à l'intérieur d'un même groupe d'échantillon, correspondant à une même origine, une grande variabilité existe, elle n'est pas due à la méthode d'analyse puisque les points correspondant à des répétitions sont proches. Elle serait probablement due à la variabilité de l'échantillon lui-même, le liège étant un matériel biologique.

4.4.2.3 Les résultats de la PLS 2

Le modèle PLS 2 appliqué aux matrices X (154 x 171) et X_{mince} (134 x 171) n'a pas permis une discrimination concluante entre les échantillons de la péninsule ibérique (Figure 43 et Figure 44).

Dans une seconde étape, plusieurs classifications ont été testées en vue de réduire la variabilité entre les échantillons d'une même origine. La Figure 45 présente la meilleure

discrimination possible parmi toutes celles que nous avons testé. Elle correspond au classement des échantillons de liège ayant subi l'influence d'un climat océanique classés par pays d'origine.

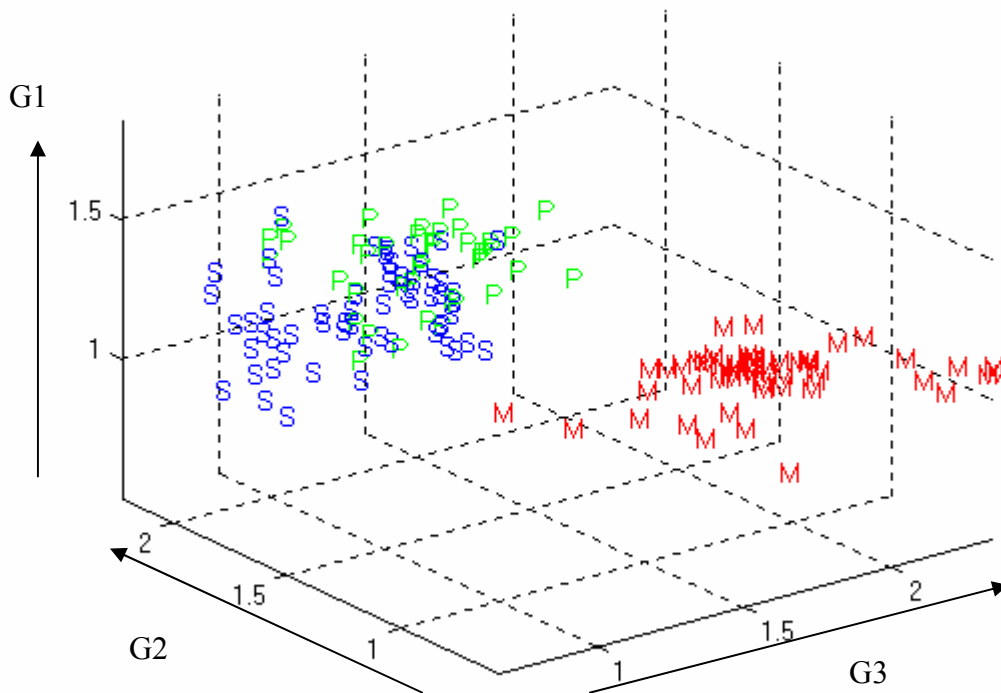


Figure 43. Projection des échantillons de X (154 x 171) dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne «S», (G2) valeur prédite du groupe Portugal «P», (G3) valeur prédite du groupe Maroc «M».

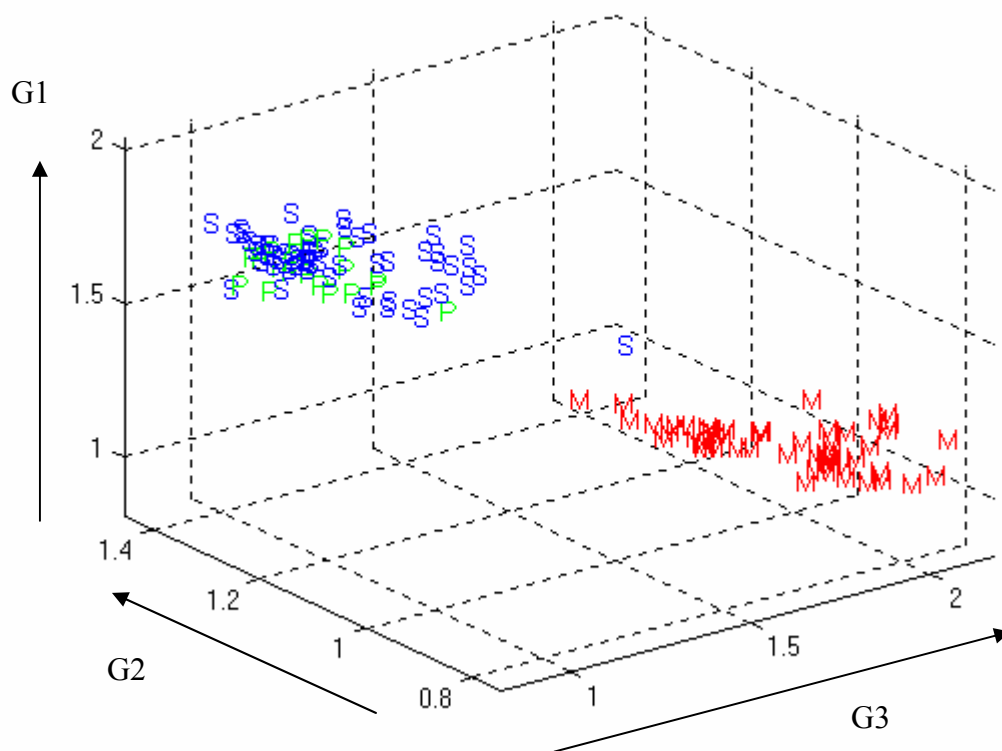


Figure 44. Projection des échantillons de X_{mince} (134 x 171) dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne «S», (G2) valeur prédite du groupe Portugal «P», (G3) valeur prédite du groupe Maroc «M».

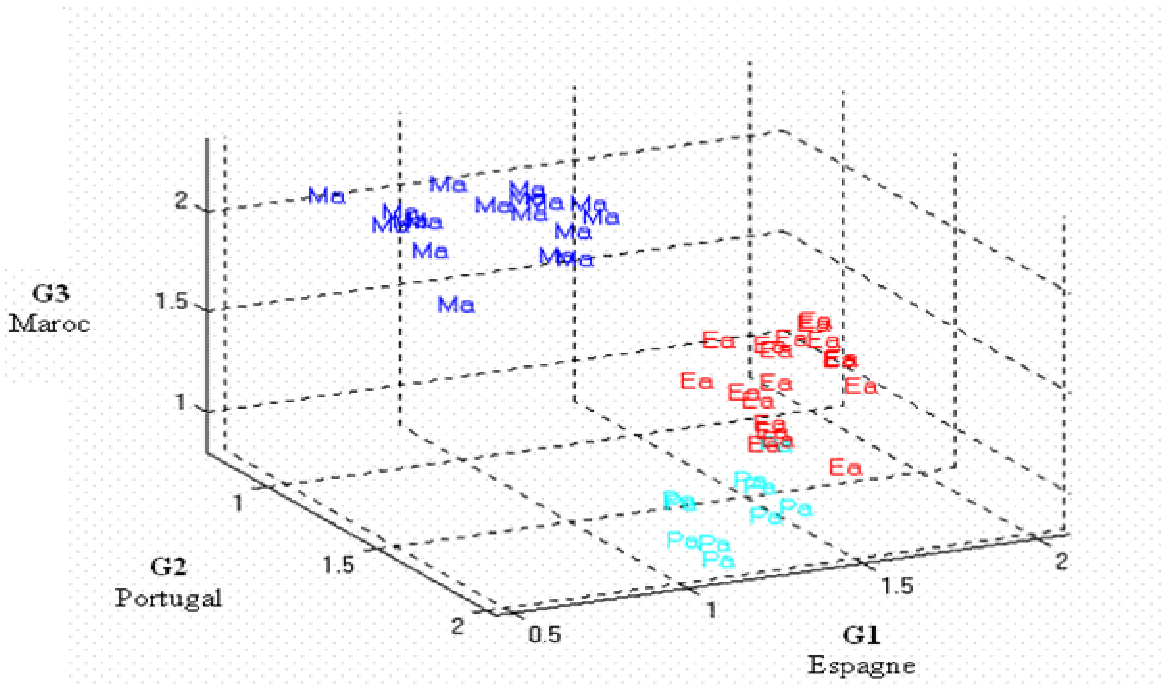


Figure 45. Projection des échantillons dans l'espace des valeurs prédites du modèle PLS. (G1) valeur prédite du groupe Espagne « atlantique » (**Ea**), (G2) valeur prédite du groupe Portugal « atlantique » (**Pa**), (G3) valeur prédite du groupe Maroc « atlantique » (**Ma**).

4.4.2.4 Conclusion

Le tandem SPME-MS a été appliqué à la râpuration de planches de liège crus dans le but d'établir des "modèles" selon les origines géographiques. Le couplage SPME-MS a présenté une erreur de répétabilité inférieure aux différences qui peuvent exister entre des planches d'une même origine. C'est donc, du point de vue analytique, un bon candidat pour l'analyse de la signature géographique du liège. Nos essais ont cependant montré que, si ce couplage permet de distinguer facilement les lièges africains des lièges ibériques, il ne donne pas accès, dans l'ensemble Portugal-Espagne, à une discrimination facile suivant l'origine.

5 Conclusion : discussion finale et perspectives

Dans ce chapitre nous discuterons les difficultés auxquelles nous nous sommes confrontés lors de la mise en place du capteur ionique au niveau des différentes étapes de l'analyse par capteurs ioniques à savoir de l'extraction des composés volatils de leur concentration par DHS et par SPME, de la détection et des méthodes de traitement des empreintes. Des solutions proposées dans ce travail ou dans la littérature seront également exposées.

5.1 Extraction - concentration et transfert des volatils

5.1.1 DHS

La première étape des mesures par capteur ioniques est la génération de l'espace de tête avant son injection dans le spectromètre de masse. Un certain nombre de paramètres régissent cette étape tels que le temps, la température, le volume de l'échantillon, etc. L'optimisation de ces paramètres doit s'effectuer selon des critères définis par rapport à la rapidité, la répétabilité et de la reproductibilité de l'analyse. La qualité du signal dépendra de cette étape.

Lors de la mise en œuvre du DHS-MS nous nous sommes confronté à la difficulté causée par l'adsorption d'eau au niveau du piège ce qui a eu pour conséquence de perturber considérablement l'ionisation des composés. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver un compromis permettant de minimiser l'effet de l'eau. Dans le cas du DHS-MS, notre solution était de substituer le système de refroidissement du piège à l'azote liquide par un système autorisant un refroidissement à l'air comprimé. Cette solution a permis de réduire les perturbations de l'ionisation observées dans l'empreinte spectrale. Elle ne présente pas l'inconvénient des dispositifs de cryopiégeage de l'eau, dispositifs qui retiennent en fait aussi les composés volatils intéressants.

Indépendamment de la présence d'interférents parmi les composés volatils extraits, le transfert du mélange à analyser doit être également optimisé. L'enjeu est alors de minimiser les risques de pertes par fuite et surtout les effets mémoire au niveau des différentes parties du système (raccords, etc.). La géométrie du système, la nature des matériaux, le chauffage de certaines zones peut alors être étudiés, sous la contrainte d'une dilution minimale de l'espace de tête. Cette contrainte implique une certaine miniaturisation des volumes et, finalement, cet aspect instrumental n'a pas été envisagé dans notre travail de thèse.

L'extraction-concentration par DHS présente enfin l'inconvénient de ne pas faire l'objet d'une offre commerciale par les grands constructeurs. Les possibilités d'automatisation restent réduites.

5.1.2 SPME

La simplicité de cette méthode est attrayante car elle permet de réduire au minimum la préparation de l'échantillon réduisant ainsi les erreurs liées à cette étape. Cette technique peut être automatisée même si notre travail est resté en dehors de cette option.

La mise en oeuvre de la SPME passe par le choix d'une phase de sorbant. Au cours de notre étude, nous avons été conduits à choisir une phase apolaire mais relativement massive (100 μm) qui permet d'obtenir le plus large profil d'espèces chimiques extraites ; sa sensibilité reste cependant médiocre pour les composés les moins lourds. Il pourrait être intéressant de développer des fibres (ou d'autres dispositifs) qui combinent cette masse d'absorbant avec de grandes surfaces –à l'échelle de la microextraction– d'adsorbant, de manière à obtenir une signature chimique volatile plus riche. La dimension des inserts de chromatographie, toujours supérieure à 5 cm, permettrait en particulier d'utiliser des fibres plus longues.

L'étude menée en utilisant la SPME a cependant confirmé certains des avantages de cette technique. D'une part, l'extraction est rapide, 10 minutes suffisant pour se rapprocher significativement de la saturation de la fibre. D'autre part, l'examen des données montre une bonne répétabilité de l'analyse après standardisation. A priori, cette répétabilité ne peut être qu'améliorée en utilisant un passeur automatique pour SPME.

5.2 Le détecteur de masse

Le détecteur de masse est susceptible de connaître des fluctuations diverses qui grèvent obligatoirement la reproductibilité, voire la répétabilité des mesures par détecteurs ioniques. Bien que certaines solutions techniques sont envisageables, comme celle proposée par Pérès (Pérès *et al.*, 2003) aucune n'est commercialement disponible et le parti a été pris, dans cette étude, d'utiliser les outils qui sont ceux de l'utilisateur industriel : calibrage du spectromètres de masse, standardisation interne des signaux. Ce parti pris n'est pas déraisonnable à court terme, comme le montre la bonne répétabilité déjà soulignée au sujet de la SPME. Il est plus discutable à plus long terme, puisque nous avons été amenés à mettre à jour une base de

données de DHS-MS pour pouvoir obtenir une bonne prédiction, sur le long terme, des défauts olfactifs des bouchons.

Dans la perspective du développement des nez électroniques, l'étude des stratégies de mise à jour des bases de données –qu'il convient de distinguer de la mise à jour des modèles, dont elle fait partie– mériterait d'être poursuivie après des travaux comme ceux de (Maalouly, 2005). Si l'on se réfère à l'olfaction des êtres vivants, on sait que le vieillissement inévitable des organes trouve un palliatif dans la mise à jour des repères olfactifs. Cette mise à jour est particulièrement efficace puisqu'elle donne à l'odorat une mémoire si remarquable qu'elle donne la substance à des impressions aussi fortes que la « madeleine de Proust ».

5.3 Application à la caractérisation du liège

Les travaux que nous avons menés permettent de tirer un bilan nuancé : il est apparaît clairement que le signaux issus d'un nez électronique fondé sur une spectromètre de masse contiennent une information chimique riche qui rend sans doute compte de caractéristiques telles, dans le cas du liège, les défauts olfactifs ou l'origine. Cette information est parfois perceptible dès le simple examen par ACP et peut, dans une certaine mesure, être extraite par des méthodes plus sophistiquées, généralement supervisées, comme la PLS.

Cependant, les difficultés que nous avons rencontrées lors de l'application de la SPME-MS conduisent à plusieurs interrogations : dans ce cas particulier, malgré l'absence d'automate, la méthode s'est avérée répétable pour chacun des échantillons ; par ailleurs, les analyses ont été conduites dans des conditions telles (notamment la durée) qu'elles n'ont pas été sujettes à des écarts de reproductibilité. Enfin, l'origine des lièges était garantie par une collaboration avec un des plus grand industriel du secteur, industriel qui avait tout intérêt à voir déboucher nos travaux. Pourtant, les résultats de prédiction de l'origine de ces lièges crus sont relativement médiocres, notamment en comparaison avec ceux obtenus sur des rondelles de liège bouilli. Notre hypothèse pour expliquer ce relatif échec est la non indépendance entre les données chimiques pertinentes et celles qui constituent le bruit de fond. Si tel est le cas, il devient difficile d'extraire, même avec des méthodes supervisées, l'information recherchée. Ce problème est d'autant plus sensible que l'amplitude de la donnée pertinente est faible. Autrement dit, il est très difficile de distinguer le spectre d'une molécule intéressante dans une signature spectrale lorsque cette molécule n'est présente qu'à de très faibles concentrations. Lorsque les concentrations sont élevées, la distinction entre signal et bruit est plus aisée ; c'est ce qui explique le très grand succès de méthodes comme la spectrométrie proche infrarouge

pour le dosage –le cas échéant en tant que méthode officielle– de constituants *majeurs* dans des produits agroalimentaires (Bertrand *et al.*, 2006). En revanche, il n'existe pas de méthodes proche infrarouge pour l'analyse de traces. De la même manière, il faut craindre que les nez électroniques soient peu à même de distinguer une information telle que l'origine dans la masse des molécules volatiles issues d'un échantillon. La difficulté serait d'autant plus grande que cette masse serait considérable : c'est ce que nous avons observé pour la prédiction de l'origine des lièges crus, riches en terpènes et autres composés synthétisés par le chêne indépendamment de son origine.

Dès lors, ce constat nous amène une double conclusion. En premier lieu, il faut encore développer les méthodes chimiométriques qui pourraient s'avérer capables de s'affranchir de très fortes interférences, qui sauraient tirer l'information du signal le plus bruité, méthodes telles que l'ICA (independent Component Analysis) et les réseaux neuronaux.

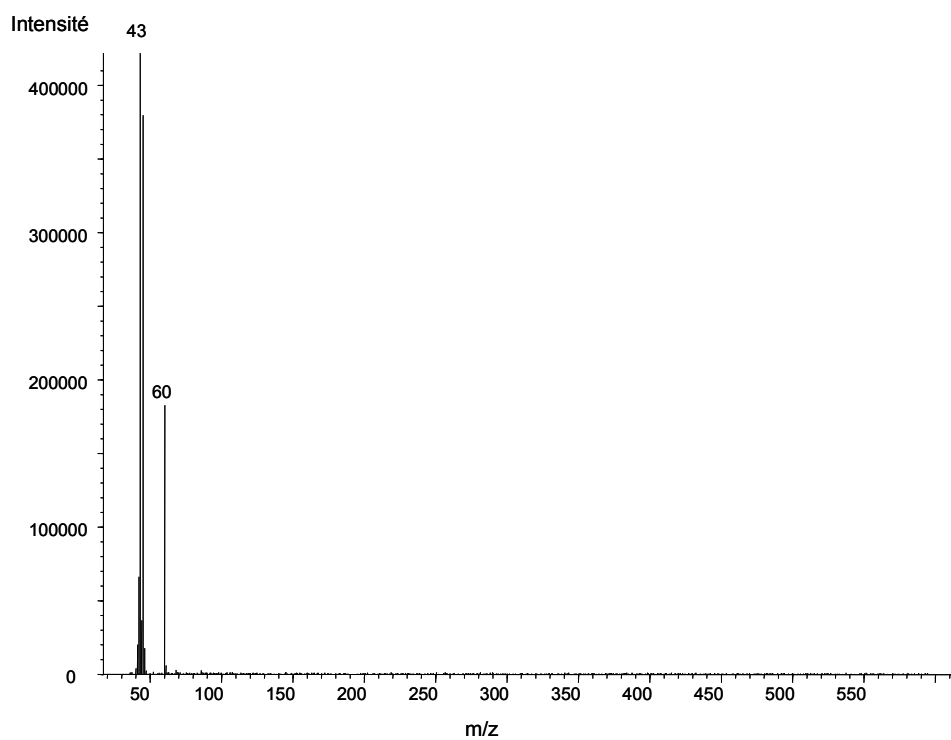
ICA appartient à la famille des méthodes dites de séparation aveugles de sources, aveugles en raison du fait que l'information propre à la matrice à traiter est inconnue. Cette matrice est dite matrice mélange, selon le vocabulaire de l'ICA, c'est-à-dire composée de signaux sources que la méthode tente de reconstituer. La reconstitution de ces signaux s'effectue par une décomposition de la matrice en une combinaison linéaire de signaux pour faire sortir des signaux aussi indépendants que possibles à partir des signaux mesurés. L'ICA est en réalité une extension de l'ACP. Tandis que l'ACP cherche à extraire des variables orthogonales dans la direction de la plus grande variabilité, l'ICA cherche des directions intéressantes dans un nuage de données multidimensionnelles en considérant que les structures intéressantes sont celles qui font apparaître le plus de non gaussianité des données projetées (Stone, 2004). Ainsi, la méthode suppose extraire l'information recherchée du bruit.

Les réseaux de neurones sont employés à des tâches de reconnaissance, de classification et de prédiction et sont adaptés au traitement des données bruitées et aux problèmes de non linéarité. Le réseau neuronal est constitué d'unités, les neurones, reliés par des liens orientés et pondérés. Il mime de ce fait, le principe de fonctionnement des neurones biologiques dont l'interconnexion crée l'intelligence. Lors de l'apprentissage d'un réseau, des données entrantes sont fournies sous forme d'un vecteur de référence vers lequel le réseau tente de converger. Une des difficultés liées à l'emploi des réseaux de neurones est la taille importante de la matrice nécessaire à l'apprentissage.

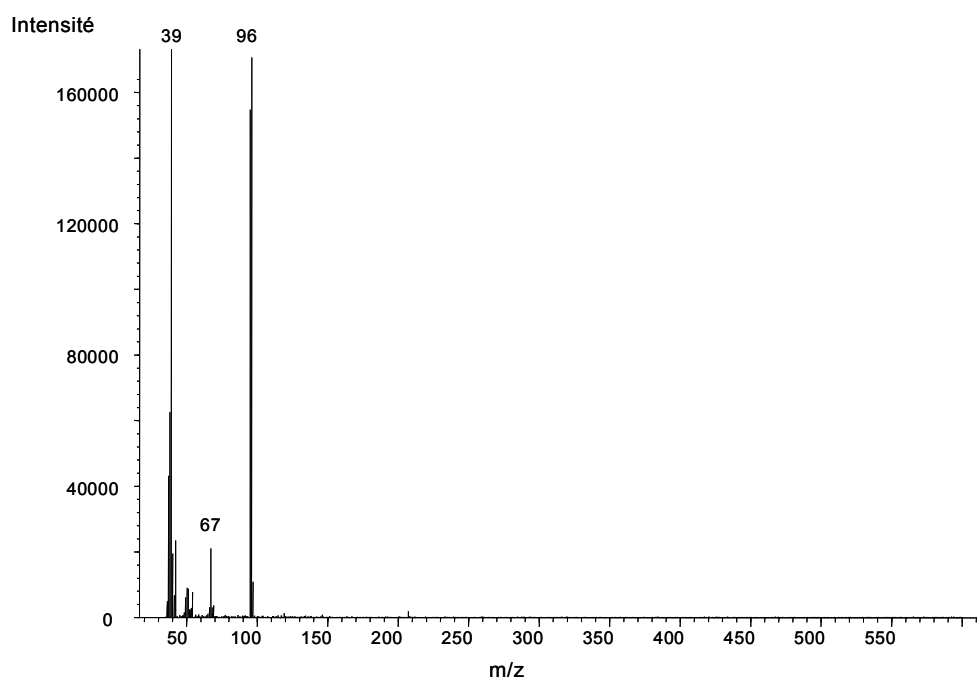
D'autre part, les approches non séparatives ne constituant pas une fin en soi, mais ayant trouvé une bonne part de leur intérêt dans leur rapidité, il convient peut être de reconsidérer les qualités de techniques comme la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse à la lumière de développement comme la « fast chromatography » ou la spectrométrie à temps de vol.

Annexes

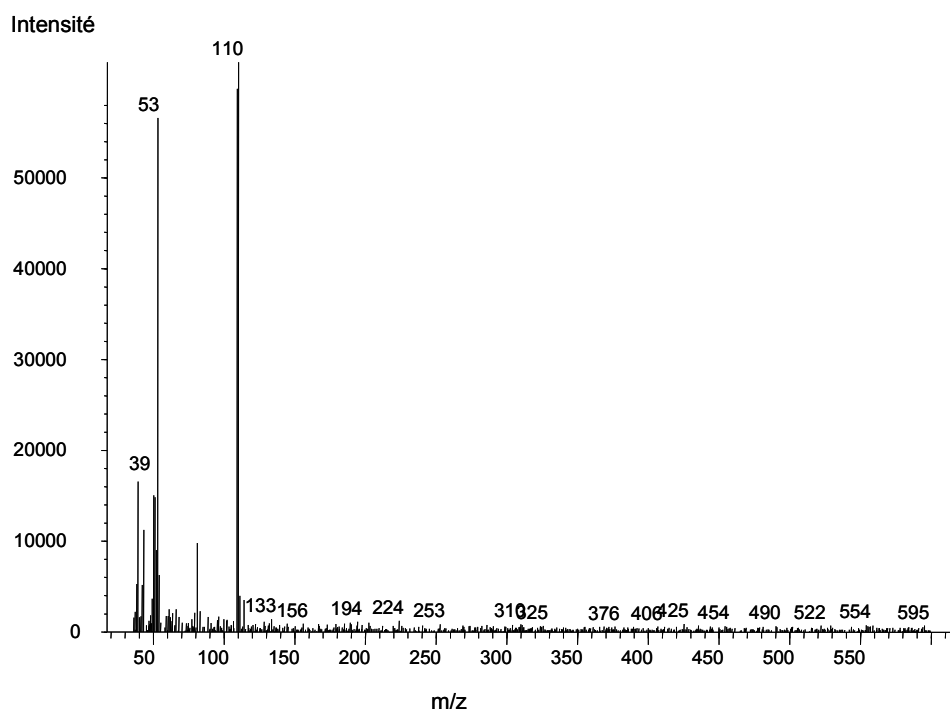
Annexe 1



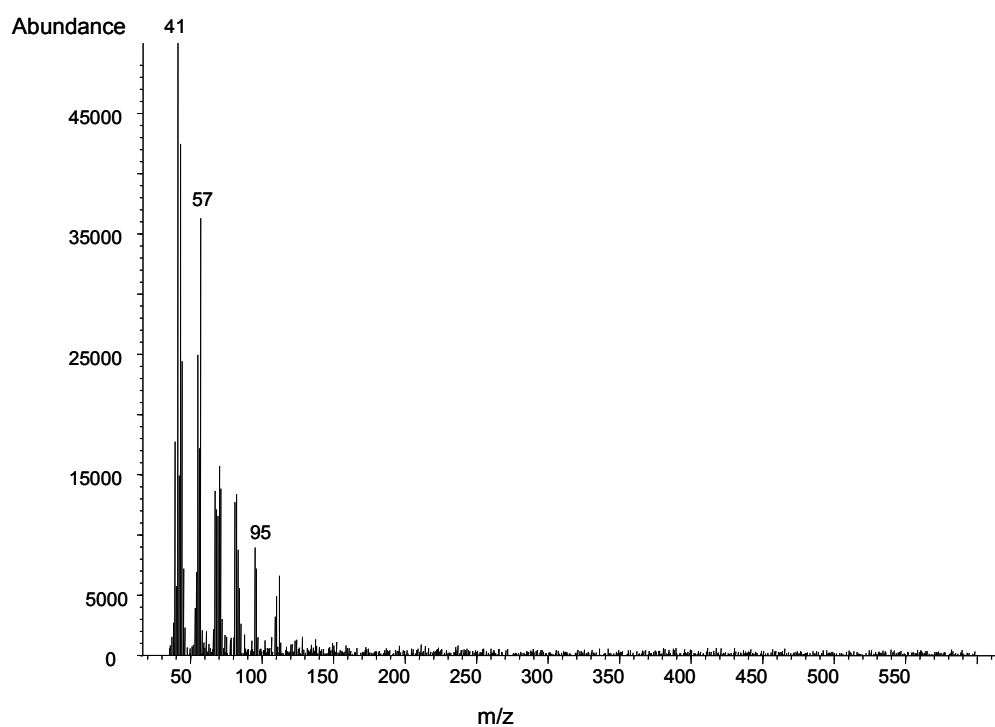
Spectre de masse pic1 : acide acétique



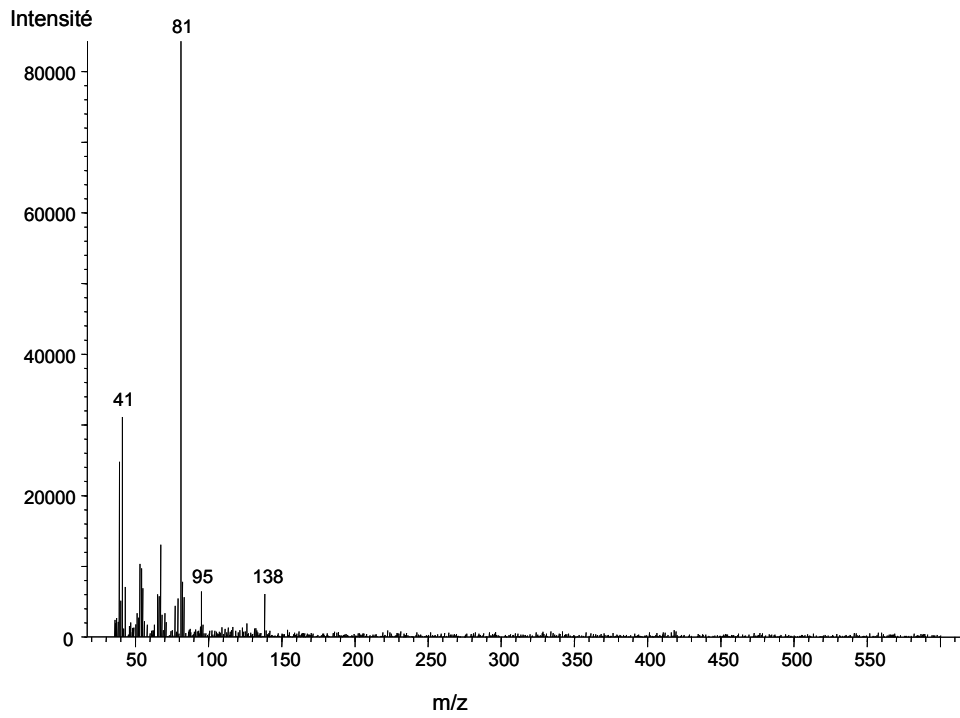
Spectre de masse pic2 :



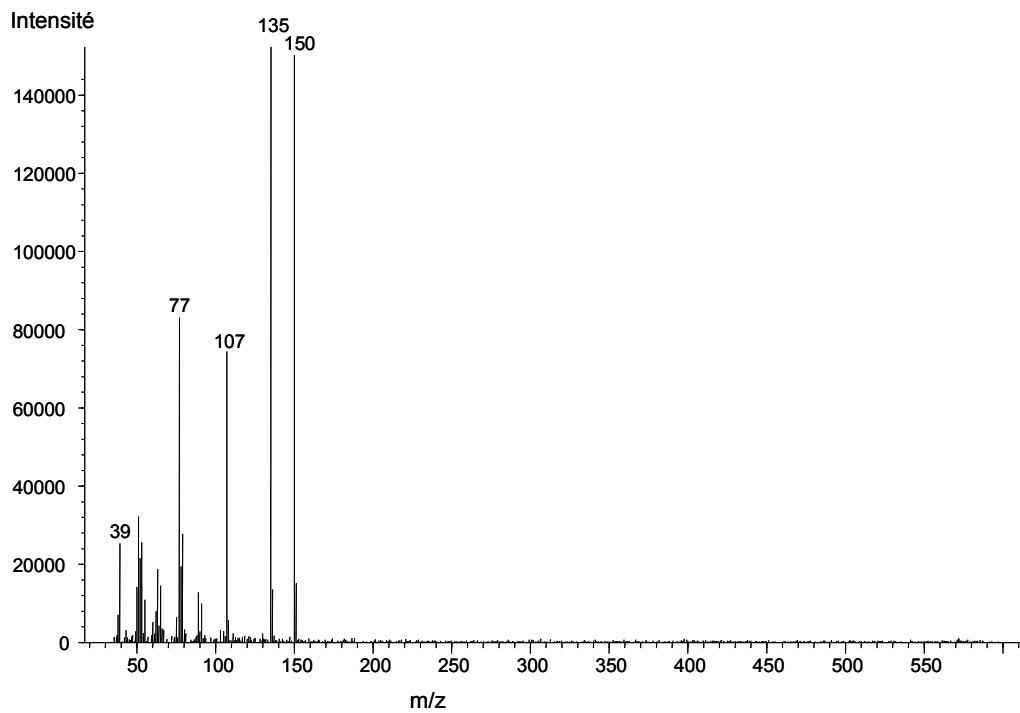
Spectre de masse pic3.



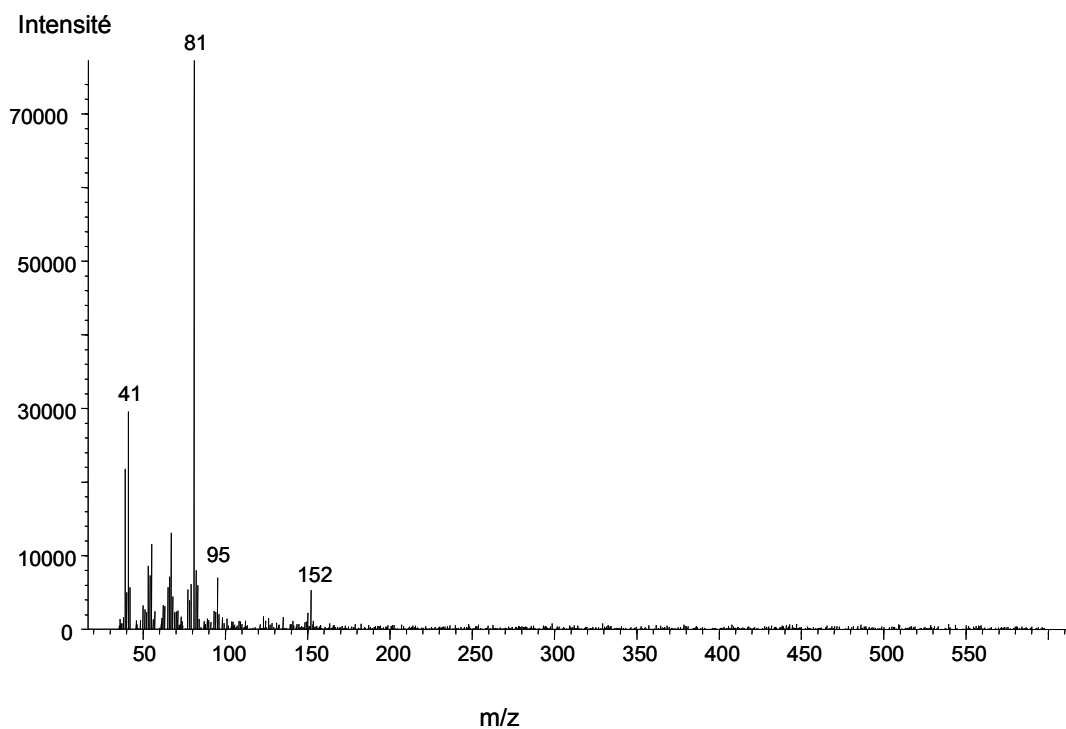
Spectres de masse pic 4.



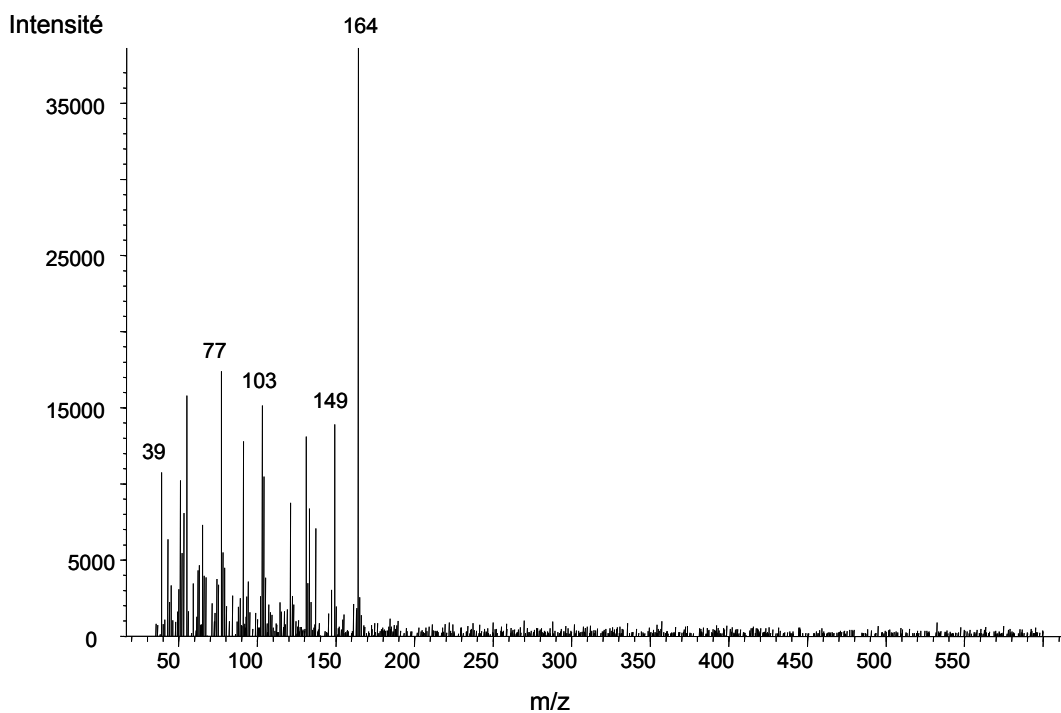
Spectre de masse pic 5.



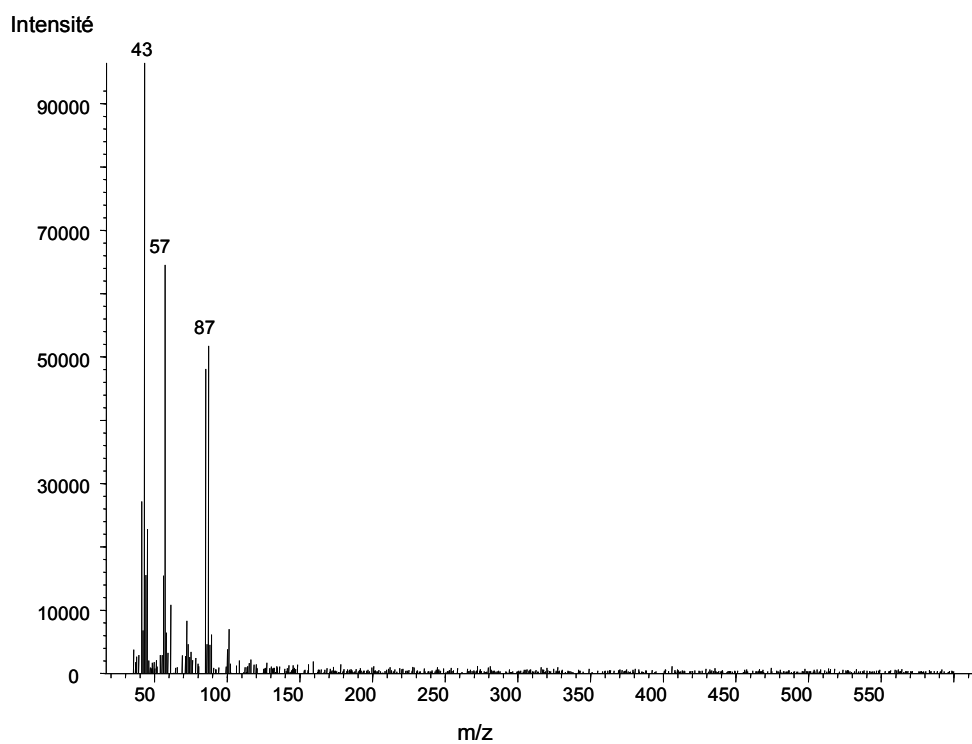
Spectre de masse pic 6.



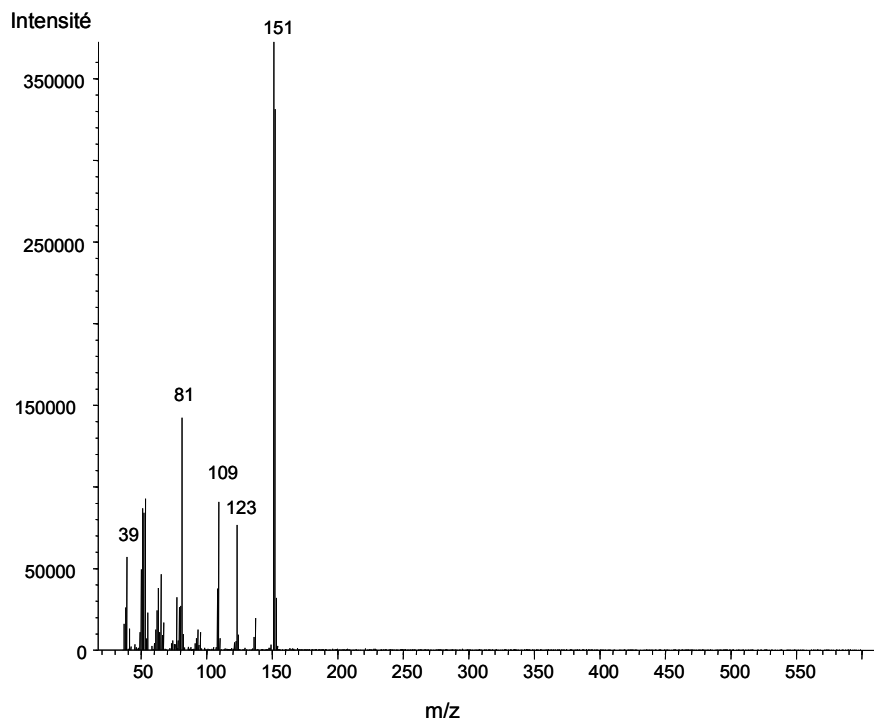
Spectre de masse du pic 7.



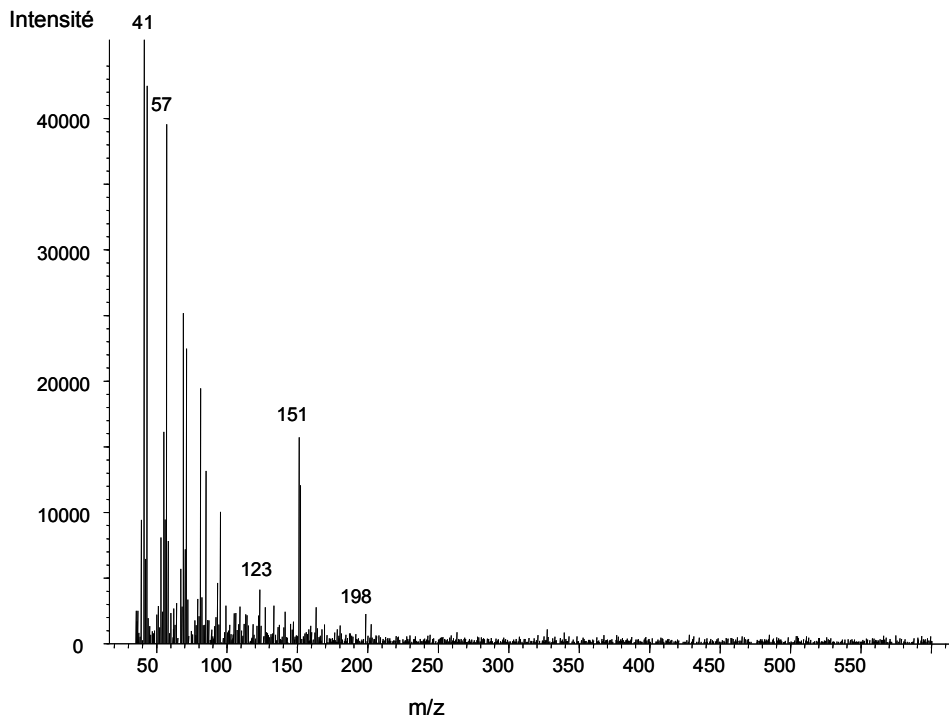
Spectre de masse du pic 8.



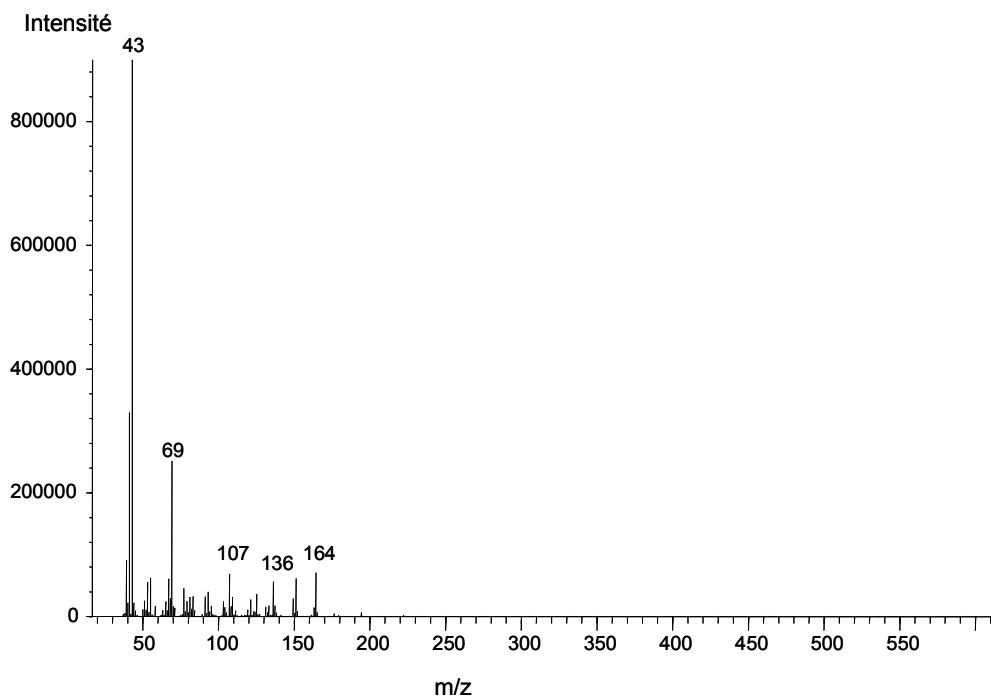
Spectre de masse du pic 9.



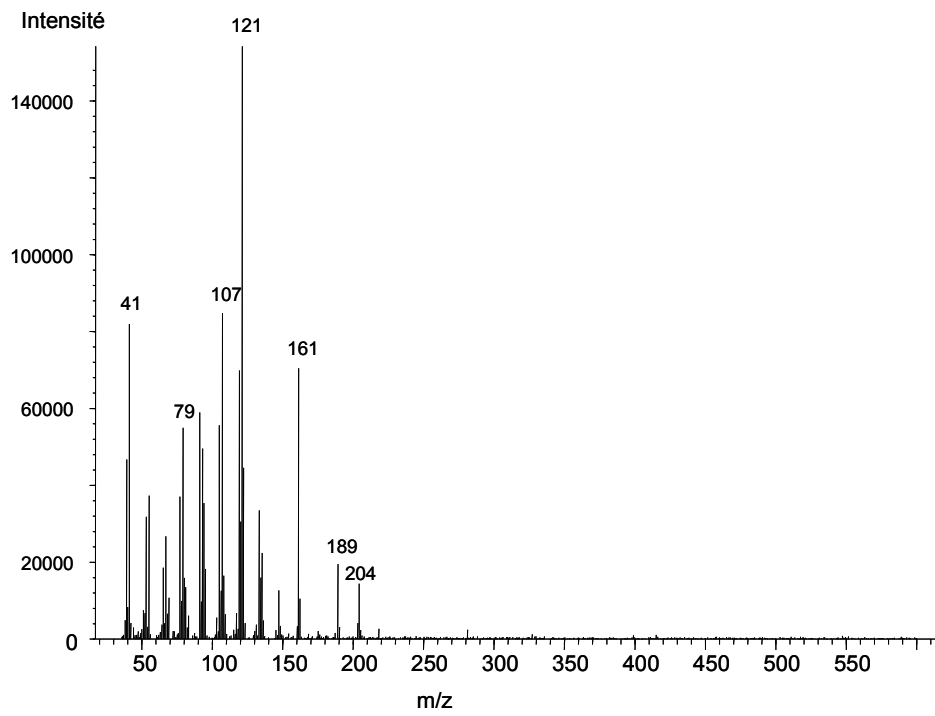
Spectre de masse du pic 10.



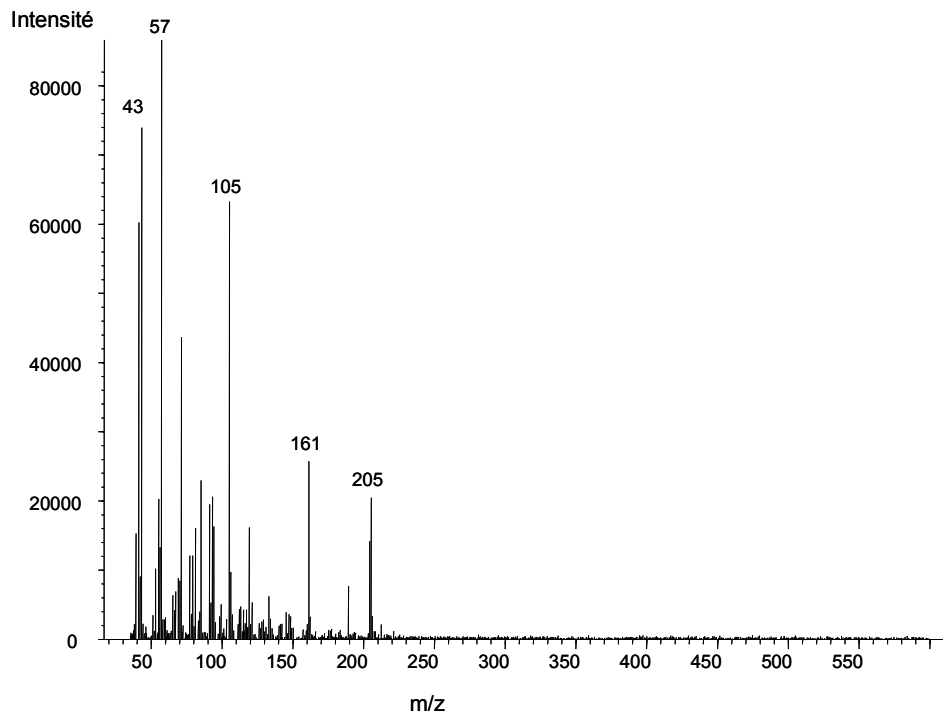
Spectre de masse du pic 11.



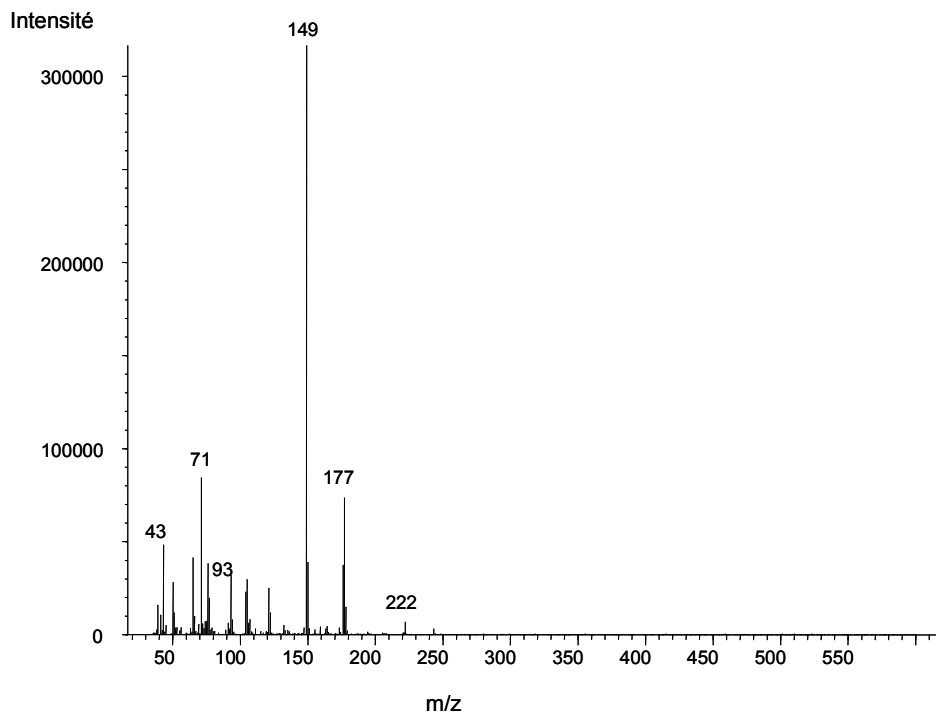
Spectre de masse du pic 12.



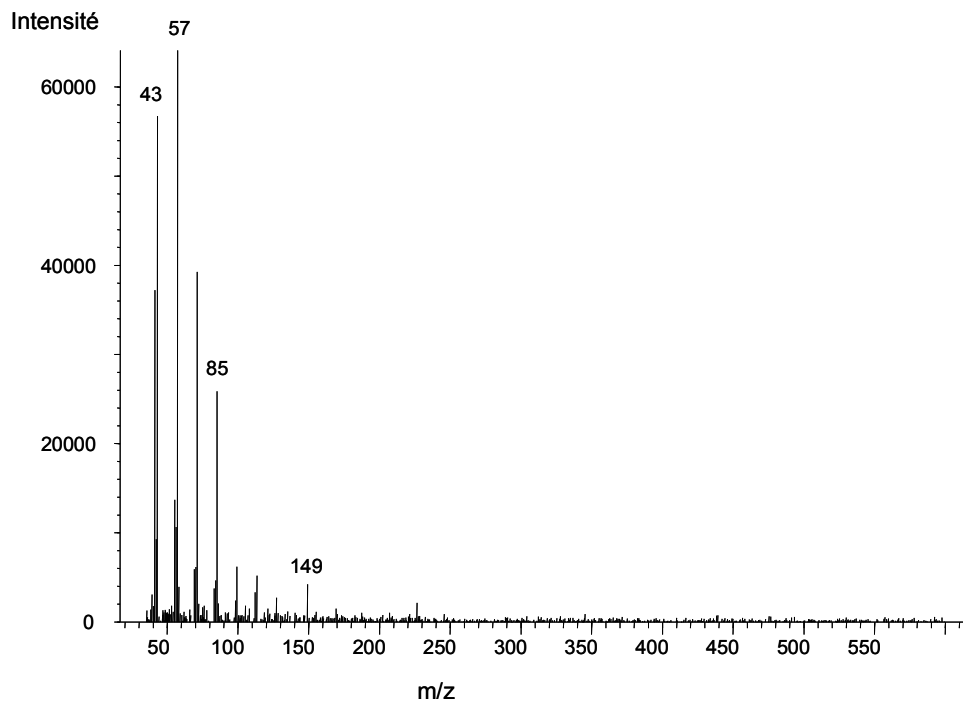
Spectre de masse du pic 13.



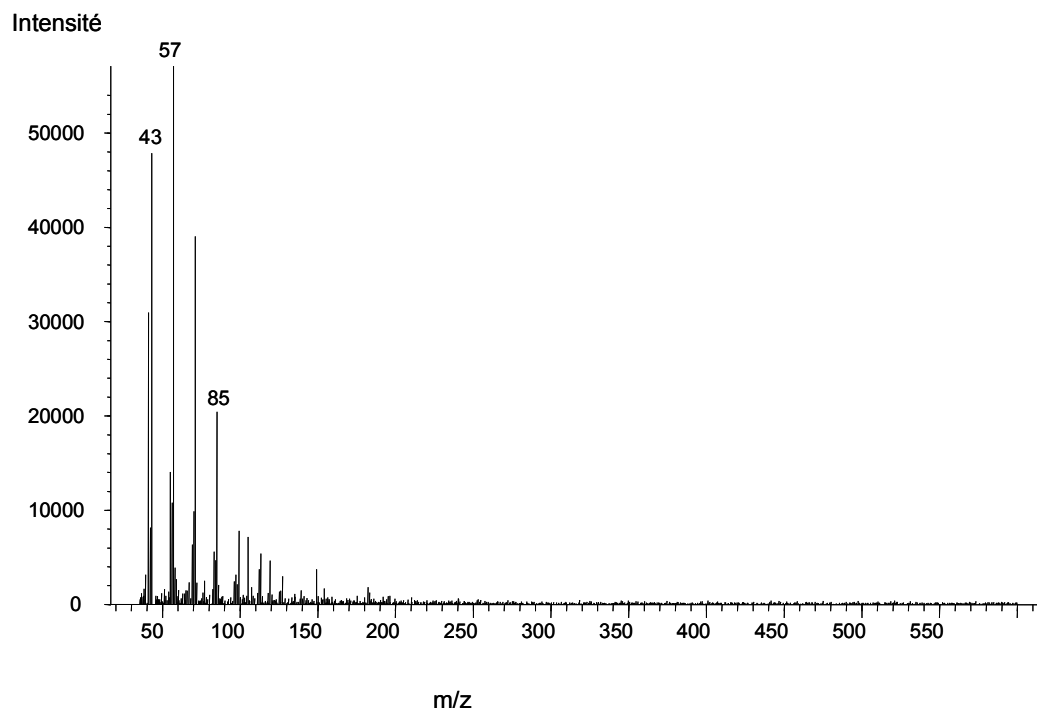
Spectre de masse du pic 14.



Spectre de masse du pic 15.



Spectre de masse du pic 16.



Spectre de masse du pic 17.

Annexe 2

Analyse de variance

L'analyse de variance calcule d'une part, une variance de répétabilité notée S^2_r , qui estime la dispersion minimale des résultats. D'autre part, une variance de reproductibilité notée S^2_R , qui estime la dispersion maximale des résultats. S^2_R englobe la variance de répétabilité (S^2_r) et la variance due au facteur non contrôlé soit une variance dite inter-jour notée S^2_J suivant la relation suivante :

$$S^2_R = S^2_r + S^2_J$$

Sachant que la variance est obtenue à partir de sommes de carrés d'écartés divisés par un nombre de degré de liberté approprié. Les paramètres des calculs sont donc les suivants :

$$S^2_r = \frac{\text{SCE}_r}{N - P} \quad \text{variance de répétabilité estimée : SCE}_r \text{ est la somme}$$

des carrés des écartés intra-jours d'analyse ou résiduelle, N est le nombre total de mesures et P le nombre de jours.

$$S^2_J = \frac{(P-1) \left(\frac{\text{SCE}_J}{P-1} - S^2_r \right)}{N'} \quad \text{variance inter-jours estimée : SCE}_J \text{ est la somme des}$$

carrés des écartés inter-jours d'analyse et N' est le nombre moyen de répétitions corrigé et il

$$s'exprime comme suit : $N' = \frac{\sum_{i=1}^p n_i^2}{N}$,$$

$$S^2_R = S^2_J + S^2_r \quad \text{variance de reproductibilité estimée.}$$

On peut alors déduire les coefficients de variations relatifs à la répétabilité et à la reproductibilité des mesures comme suit :

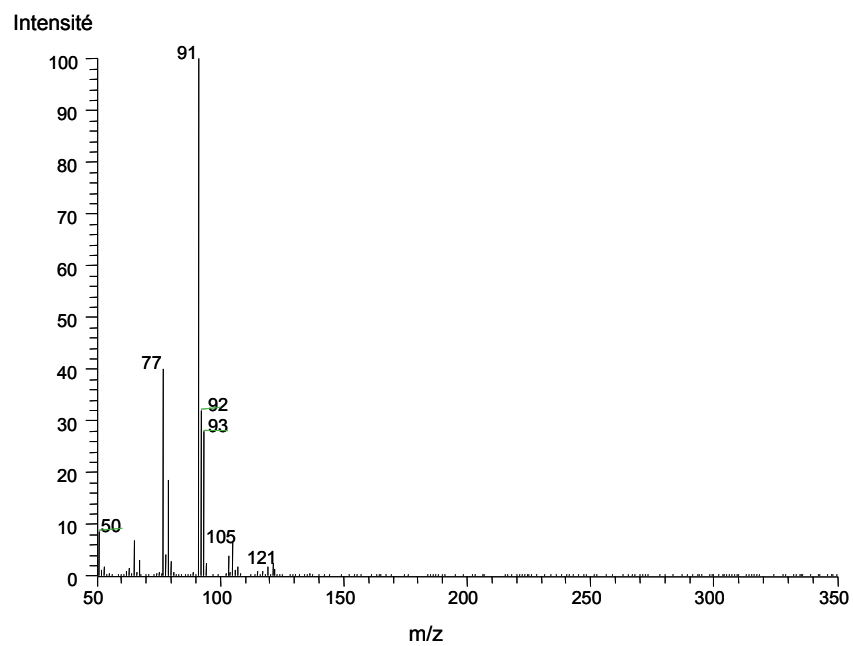
$$CV_r = 100 \times \frac{S_r}{\text{moyenne}} \quad \text{coefficient de variation de la répétabilité}$$

$$CV_R = 100 \frac{S_R}{\text{moyenne}} \quad \text{coefficient de variation de la reproductibilité}$$

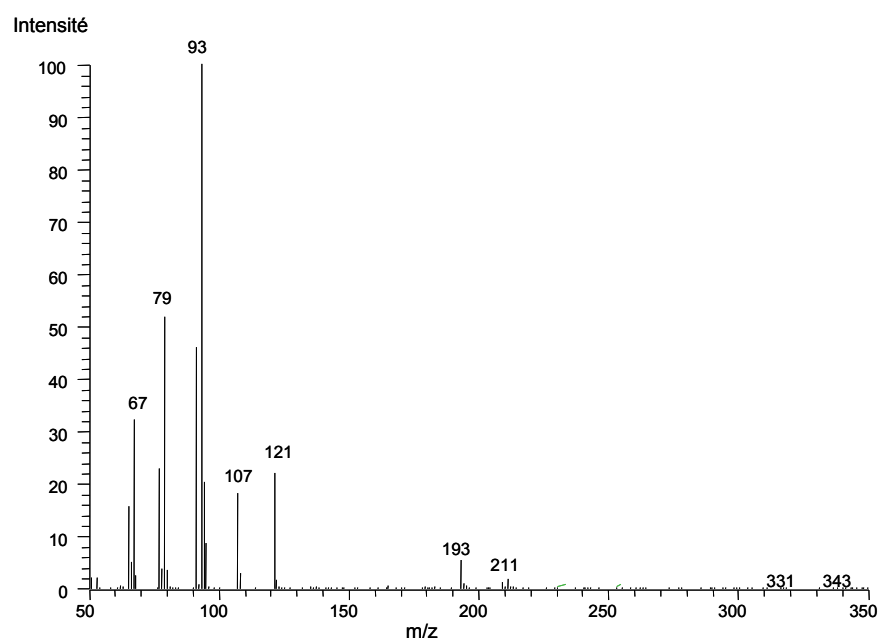
Mais ceci n'indique pas si les valeurs obtenues sont trop élevées. Nous avons fait appel au modèle empirique proposé par Horwitz et cité dans l'ouvrage de Feinberg (1996) « validation des méthodes d'analyse ». Ce modèle fournit une formule de calcul du coefficient de variation limite de la reproductibilité CV_{lim} en fonction de la moyenne de l'échantillon tel que :

$$CV_{\text{lim}} \leq 2^{2 - \log_2 \left(\frac{\log(\bar{x})}{2} \right)}$$

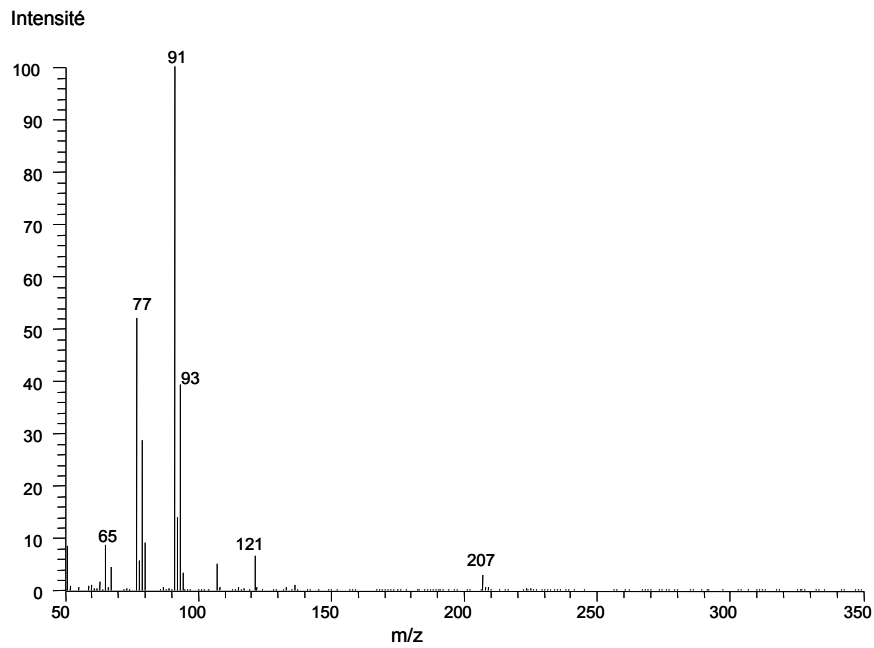
Annexe 3



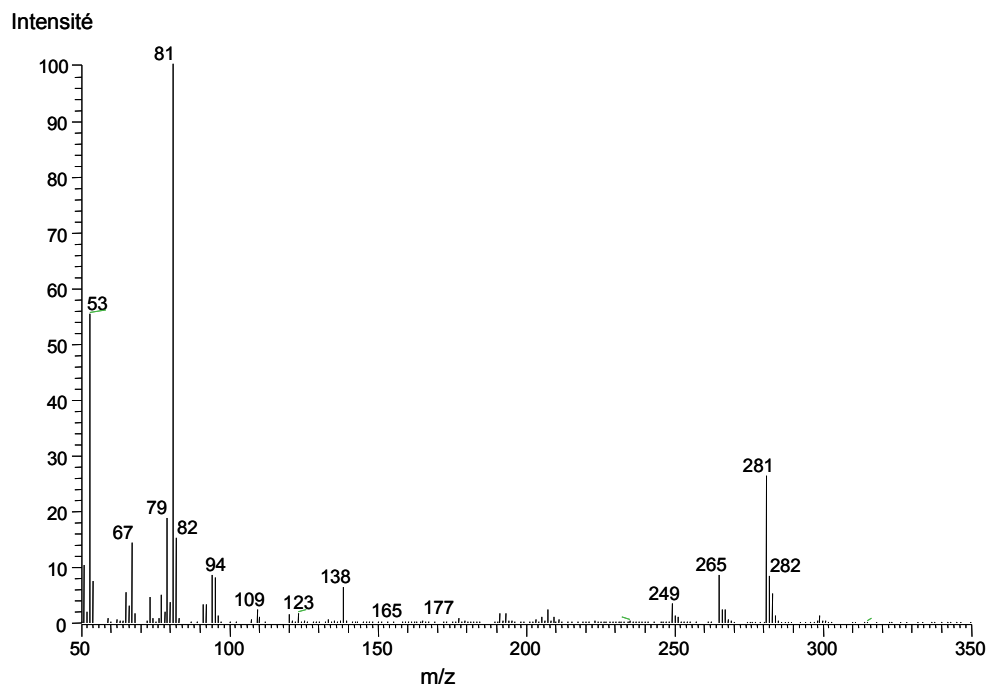
Spectre de masse du pic 1.



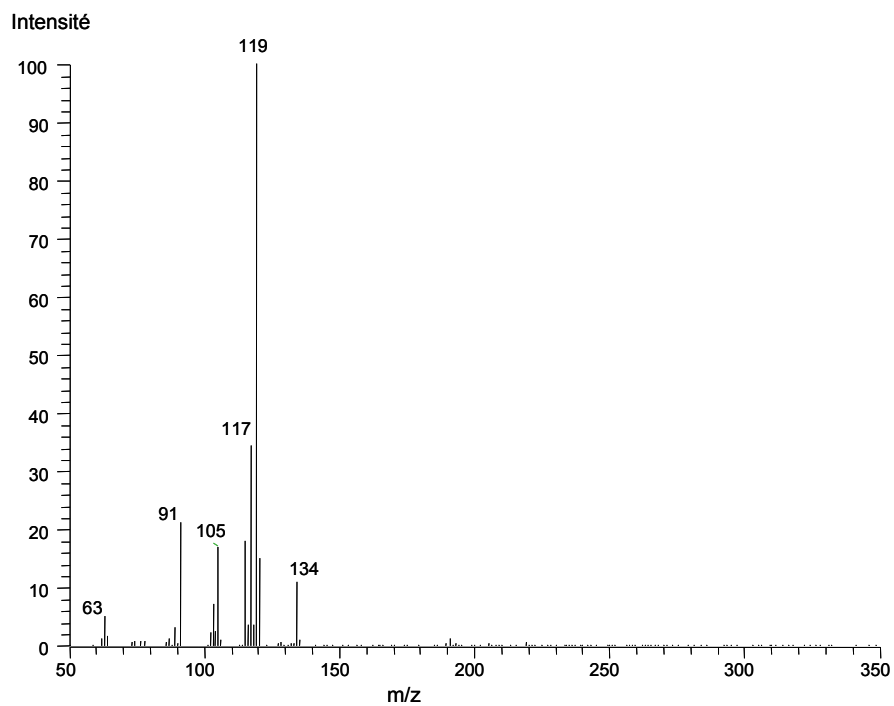
Spectre de masse du pic 2.



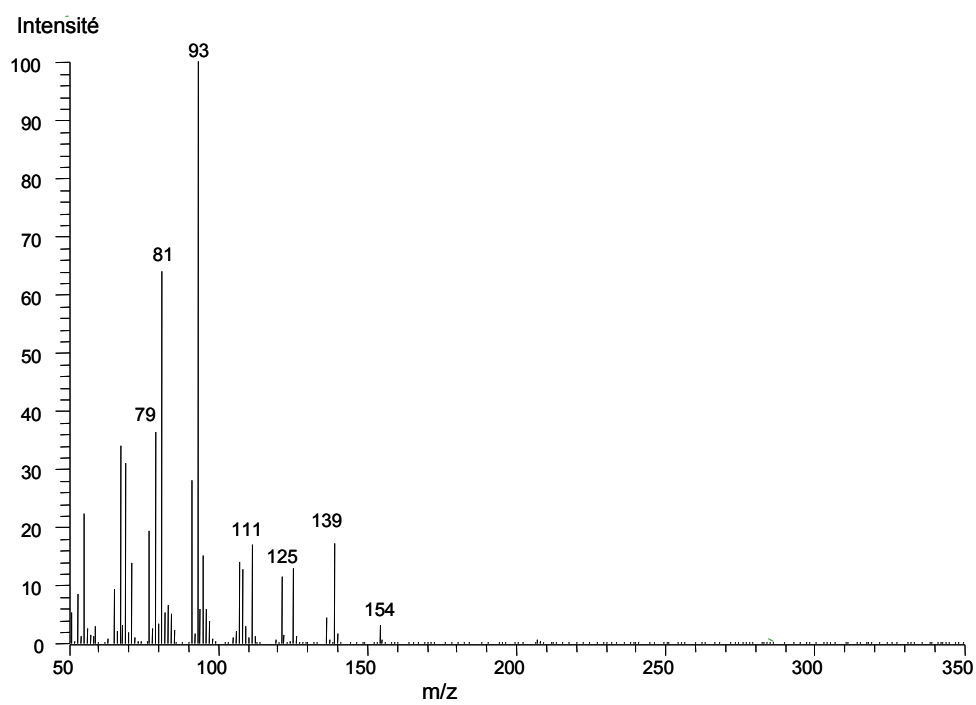
Spectre de masse du pic 3.



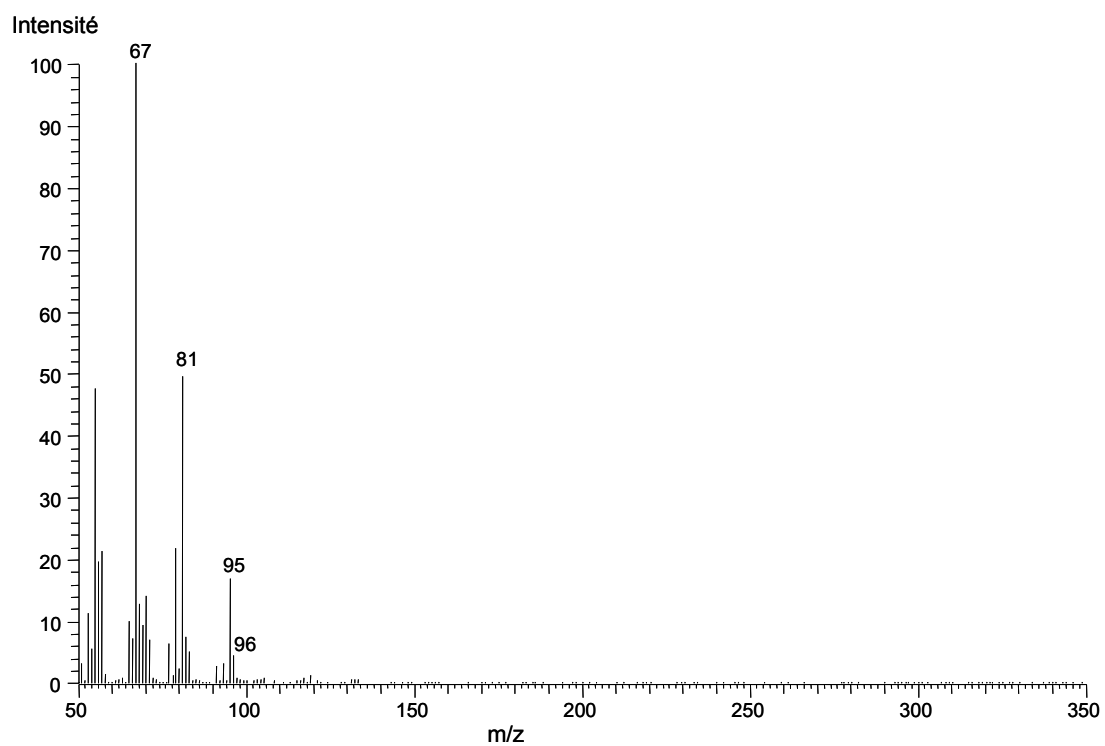
Spectre de masse du pic 4.



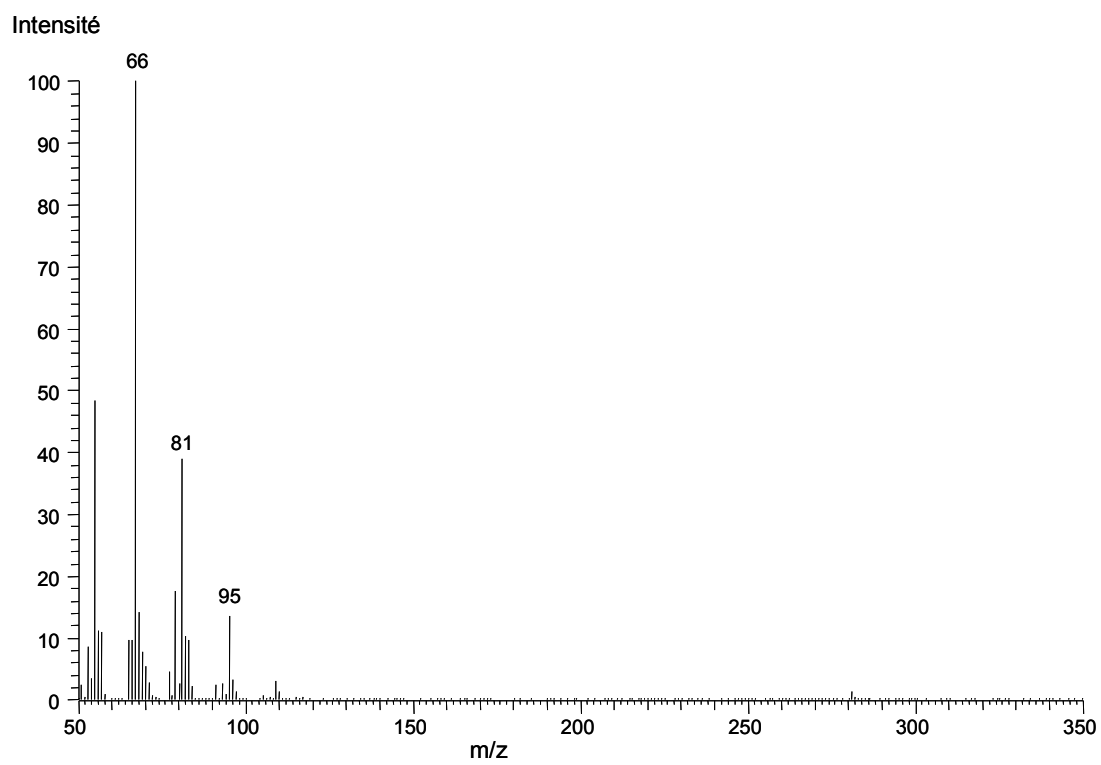
Spectre de masse du pic 5.



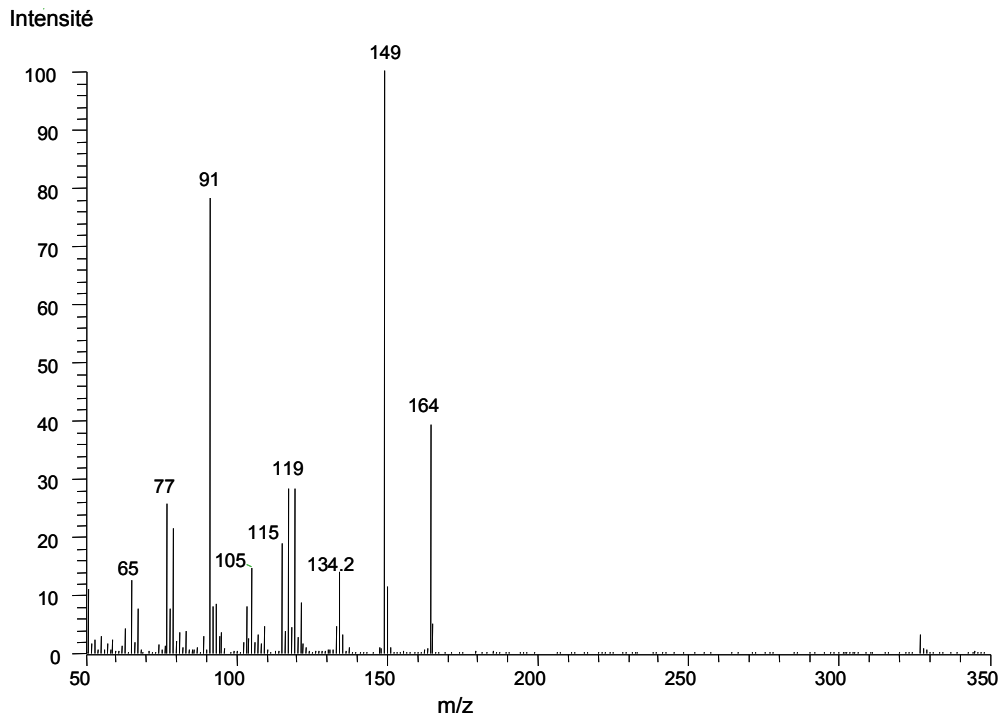
Spectre de masse du pic 6.



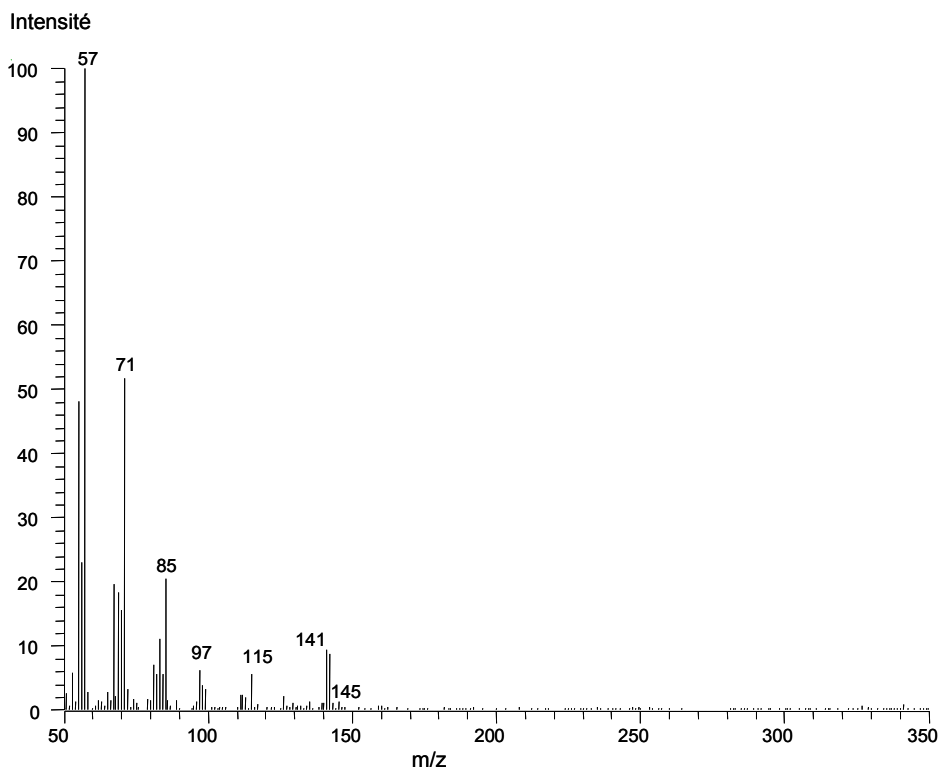
Spectres de masse du pic 7.



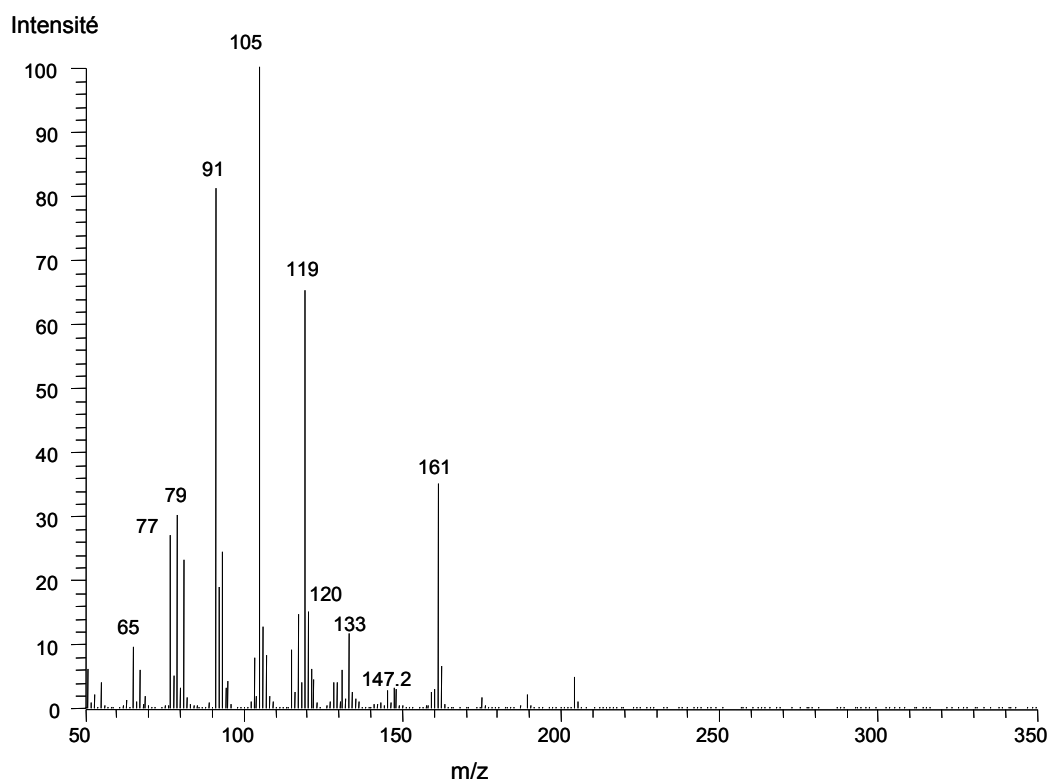
Spectres de masse du pic 8.



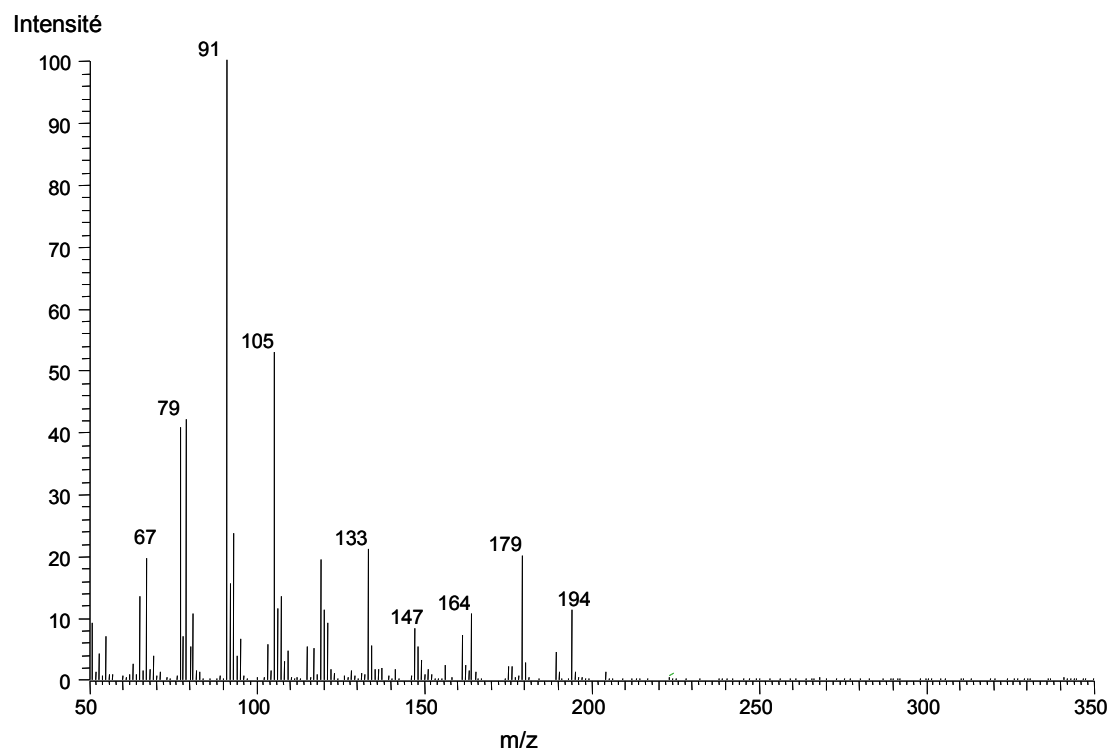
Spectres de masse du pic 9.



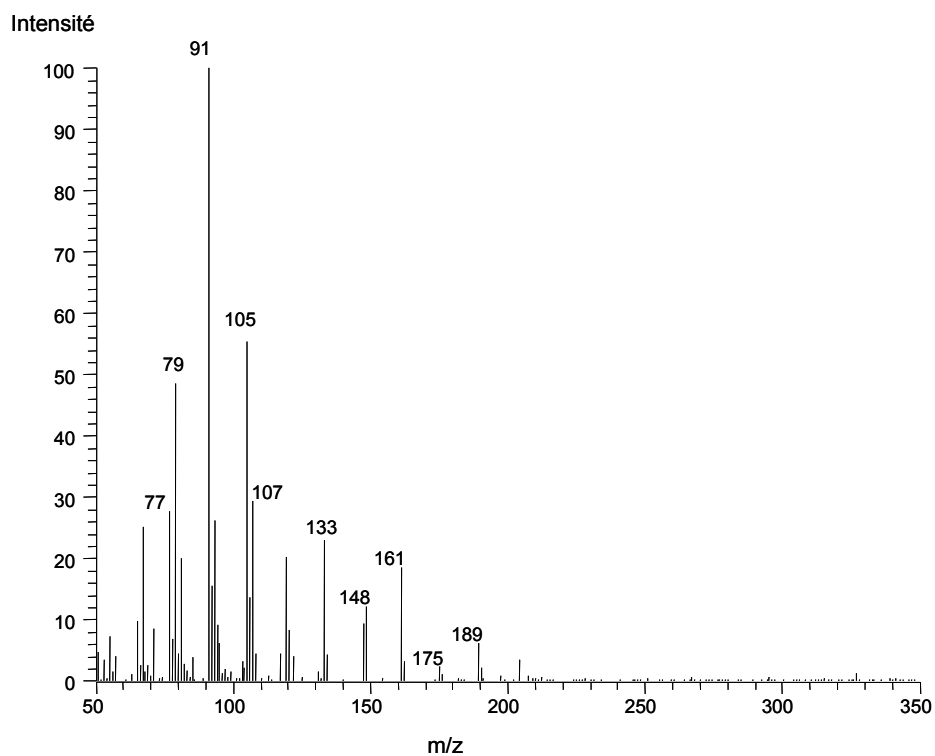
Spectres de masse du pic 10.



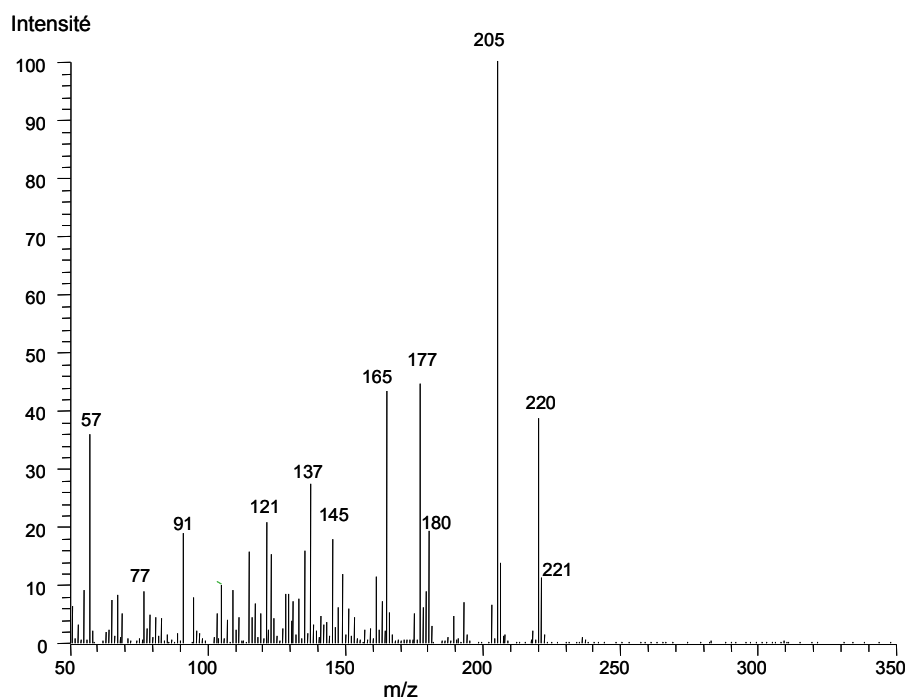
Spectres de masse du pic 11.



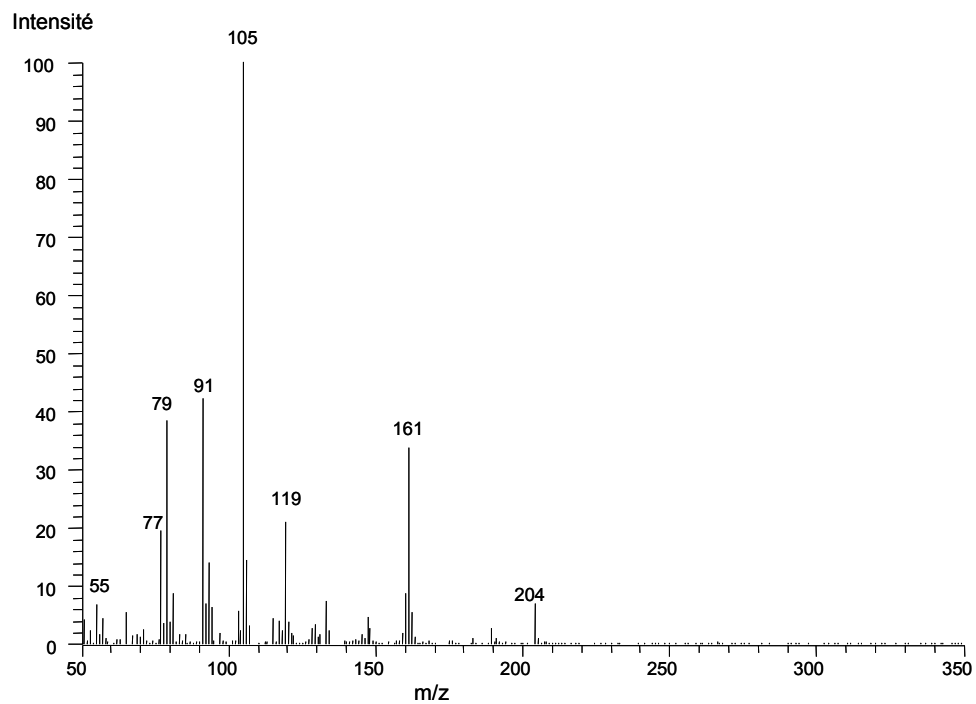
Spectres de masse du pic 12.



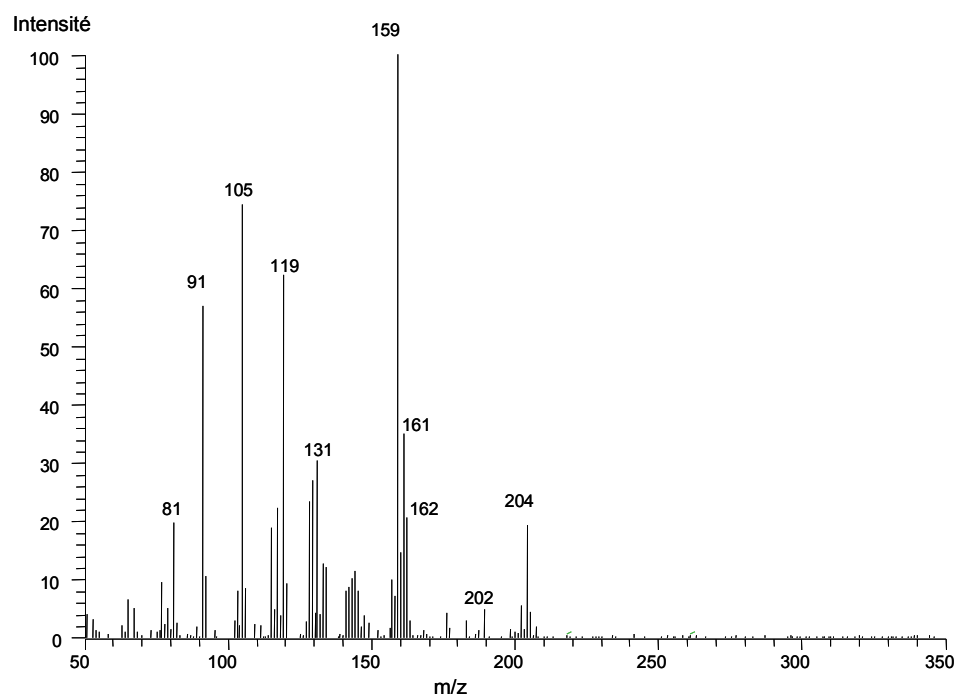
Spectres de masse du pic 13.



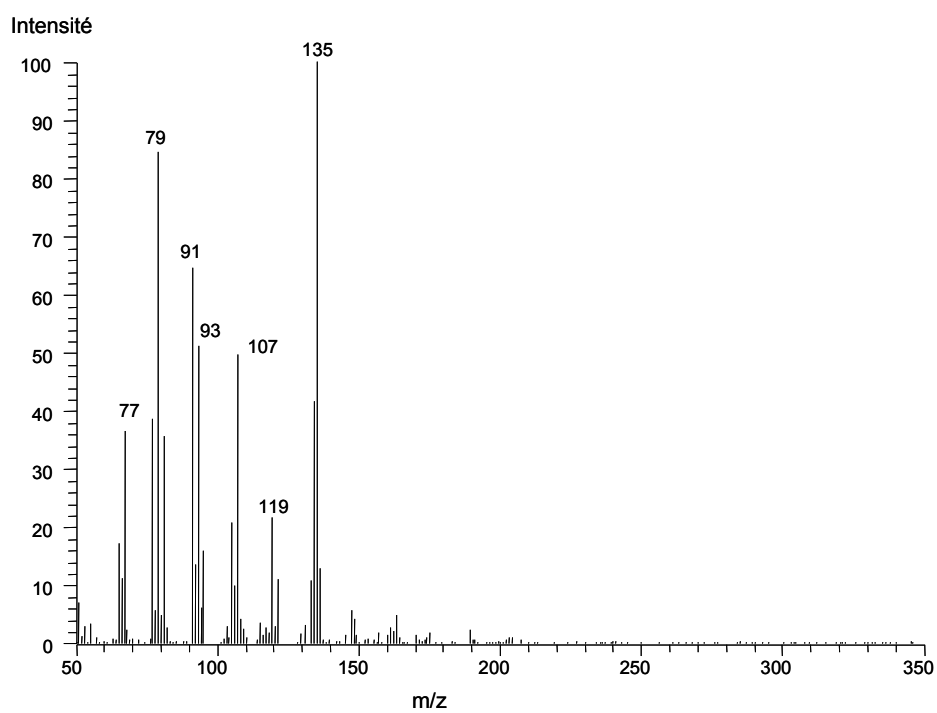
Spectres de masse du pic 14.



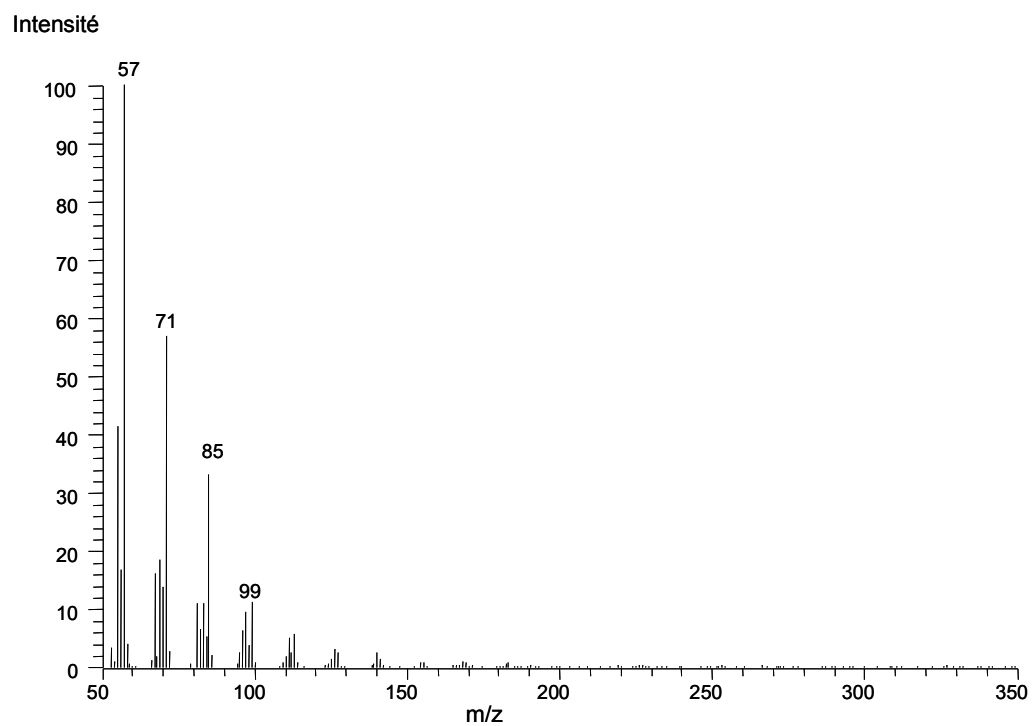
Spectres de masse du pic 15.



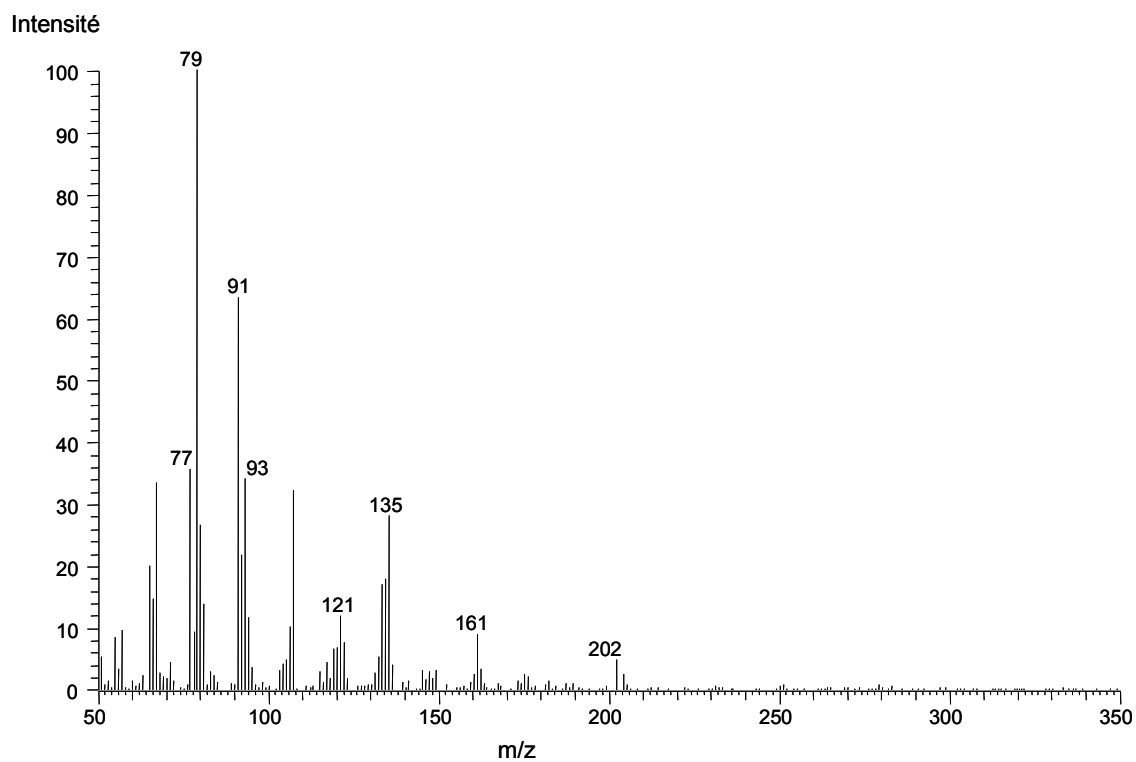
Spectres de masse du pic 16.



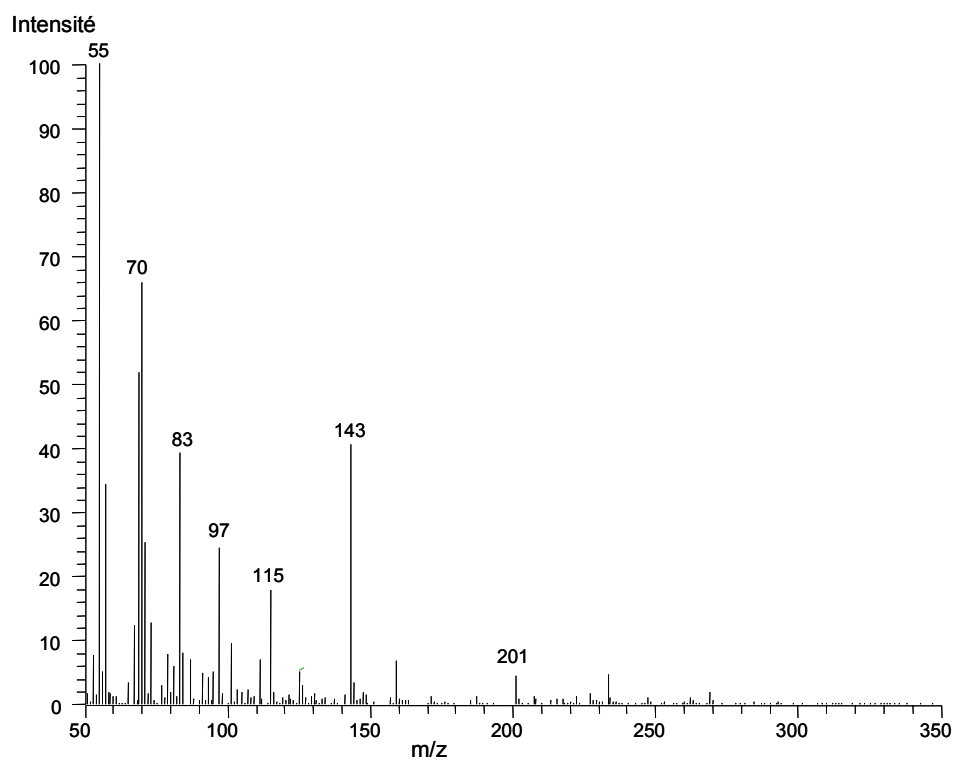
Spectres de masse du pic 17.



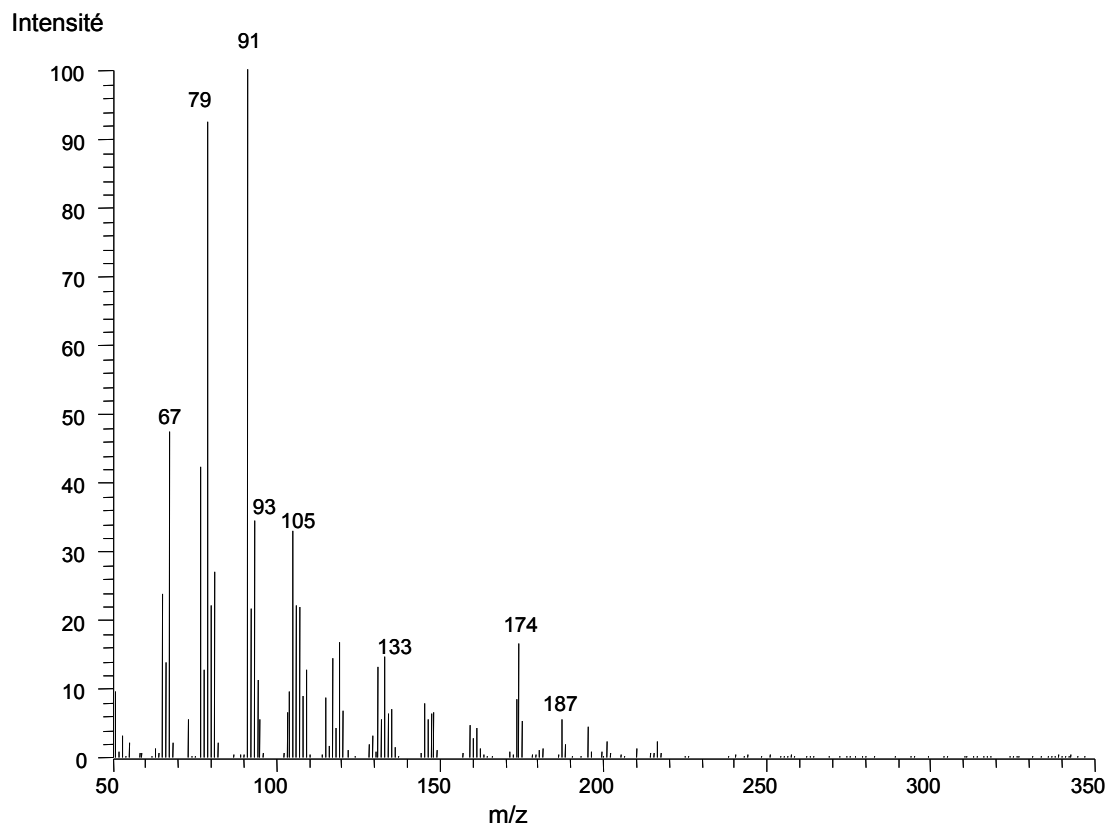
Spectres de masse du pic 18.



Spectres de masse du pic 19.



Spectres de masse du pic 20.



Spectres de masse du pic 21.

Bibliographie

Alvarez-Rodriguez, M. L., Belloch, C., Villa, M., Uruburu, F., Larriba, G. et Coque, J.-J. R., *Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples*. FEMS Microbiology Letters, 2003. **220**(1): p. 49-55.

Amon, S. M., Wandepier, J. M. et Simpson, R. F., *Compounds responsible for cork taint*. Australian wine industry journal, 1989. **2**: p. 62-69.

Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A. et Witter, *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Ed : Masson, Paris, 1995.

Arthur, C. L. et Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145 - 2148.

Barros, A., *Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques*. Thèse INA-PG, 1999.

Begnaud, F. et Berdagué, J.-L., *Influence of ionisation energy on the quality of static headspace-mass spectrometry spectral fingerprints*. Sensors and actuators, 2002. **81**: p. 351-358.

- Begnaud, F., Pérès, C. et Berdagué, J.-L., *Static Headspace - Mass spectrometry (SHS-MS): Handling breakdown and temporal drifts* In *6th Food Authenticity and Safety International Symposium, Nantes, France*. 2001.
- Bento, M., F, Pereira, H., Cunha, M., A, Moutinho, A., M, C, Van Den Berg, K., J et Boon, J., J, *A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. Using thermally assisted transmethylation GC-MS*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2001. **57**: p. 45-55.
- Berdagué, J. L., Vernat, G. et Rossi, V., *Caratérisation instrumentale de la qualité des matières premières et des aliments par analyse des composés volatils*. *Viandes prod. carnés*, 1993. **14**(5): p. 135-138.
- Berdagué, J. L., Viallon, C., Begnaud, F. et Frençia, J. P., *Stérilisation des viandes et des farines de viandes : prédiction des barèmes de cuisson par la méthode d'espace de tête statique-spectrométrie de masse*. *Viandes et Produits carnés*, 2000. **21**(1): p. 3-10.
- Berna, A. Z., Buysens, S., Natale, C. D., Grun, I. U., Lammertyn, J. et Nicolai, B. M., *Relating sensory analysis with electronic nose and headspace fingerprint MS for tomato aroma profiling*. *Postharvest Biology and Technology*, 2005. **36**(2): p. 143-155.
- Bertrand, A. et Barrios, M.-L., *Contamination de bouchons par les produits de traitements de palettes de stockage des bouteilles*. *Revue française d'oenologie*, 1994. **34**(149): p. 29-32.
- Bertrand, D. et Dufour, E., *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, ed. Tec&Doc. 2006, Paris.
- Boidron, J. N., Chatonnet, P. et Pons, P., *Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins*. *Connaissance Vigne Vin*, 1988. **22**(4): p. 275-294.
- Boidron, J. N., Lefevre, A., Riboulet, J. M. et Ribereau-Gayon, P., *Les substances volatiles susceptibles d'être cédées au vin par le bouchon de liège*. *Science des aliments*, 1984. **4**: p. 609-616.
- Bordas, F., *Sur la maladie de la tache jaune des lièges*. *Bull. Acad. Sc*, 1904. **138**(15): p. 928-929.
- Boudaoud, N. et Eveleigh, L., *A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers*. *J. Agric. Food Chem*, 2003. **51**: p. 1530-1533.

- Buratti, S., Benedetti, S., Scampicchio, M. et Pangerod, E. C., *Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **525**(1): p. 133-139.
- Buser, H.-R., Zanier, C. et Tanner, H., *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*. *J. Agric. Food Chem.*, 1982. **30**(2): p. 359-362.
- Caldentey, P., Fumi, M. D., Mazzoleni, V. et Careri, M., *Volatile compounds produced by microorganisms isolated from corks*. *Flavour and fragrance journal*, 1998. **13**: p. 185-188.
- Canac-Arteaga, D., Viallon, C. et Berdagué, J. L., *Effect of a dry purge step on the analysis of a dry purge step on the analysis by dynamic headspace-GC-MS of the volatile fraction of a cheese*. *Analisis*, 1999 a. **27**: p. 780-785.
- Canac-Arteaga, D., Viallon, C. et Berdagué, J. L., *Effect of a condenser on the analysis by dynamic headspace-GC-MS of the volatile fraction of a cheese*. *Analisis*, 1999 b. **27**: p. 864-870.
- Canac-Arteaga, D., Viallon, C. et Berdagué, J. L., *Analytical artifacts caused by the presence of water vapor in the headspace of food product*. *Analisis*, 2000. **28**: p. 550-556.
- Cantagrel, R. et Vidal, J. P., *Research on compounds responsible for cork taint in cognacs*. *Proceeding of 6 th international flavor conference*, 1989. **139**.
- Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J.-M. et Casanova, J., *Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.)*. *Industrial Crops and Products*, 2002. **15**(1): p. 15-22.
- Chatonnet, P., Guimberteau, G., Dubourdiou, D. et Boidron, J. N., *Nature et origine des odeurs de "moisi" dans les caves. Incidences sur la contamination des vins*. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 1994. **28**(2): p. 131-151.
- Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C. et Gandini, A., *Cork suberin as a new source of chemicals.: 1. Isolation and chemical characterization of its composition*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1998. **22**(2): p. 71-80.
- Costa Freitas, A. M., Parreira, C. et Vilas-Boas, L., *The Use of an Electronic Aroma-sensing Device to Assess Coffee Differentiation--Comparison with SPME Gas Chromatography-Mass Spectrometry Aroma Patterns*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001. **14**(5): p. 513-522.

de Fatima Alpendurada, M., *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 3-14.

Dittmann, B. et Nitz, S., *Strategies for the development of reliable QA / QC methods when working with mass spectrometry-based chemosensory systems*. Sens. Actuators, B, Chem, 2000. **69**: p. 253-257.

Dubois, P., *Les arômes des vins et leurs défauts*. Revue française d'oenologie, 1994. **145**: p. 27-39.

Evans, T. J., Butzke, C. E. et Ebeler, S. E., *Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1997. **786**(2): p. 293-298.

Feinberg, M., *La validation des méthodes d'analyse*. Masson ed. 1996, Paris. 392.

Fuller, P., *Cork taint: Closing in on an industry problem*. Aust. N. Z. wine ind. J, 1995. **10**: p. 58-60.

Gallois, A. et Langlois, D., *New results in the volatile odours compounds of French cheese*. Le Lait, 1990. **70**: p. 89-106.

Gardner, J. W. et Bartlett, P. N., *A brief history of electronic noses*. Sensors and Actuators B, 1994. **18-19**: p. 211-220.

Geladi, P. et Kowalski, B. R., *Partial Least-Squares Regression: a Tutorial*. Analytica Chimica Acta, 1986. **185**: p. 1-17.

Gerber, N. N., *Sesquiterpenoids from Actinomycetes*. Phytochemistry, 1972. **11**: p. 385-388.

Goodner, K. L. et Roussef, R. L., *Using an ion-trap MS sensor to differentiate and identify individual components in grapefruit juice headspace volatiles*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. **49**: p. 250-253.

Hansen, T., Petersen, M. A. et Byrne, D. V., *Sensory based quality control utilising an electronic nose and GC-MS analyses to predict end-product quality from raw materials*. Meat Science, 2005. **69**(4): p. 621-634.

Huon De Kermadec, F., *Méthodes statistiques permettant d'expliquer l'appréciation hédonique par les caractéristiques sensorielles.*, in *Thèse, Université Montpellier II*. 1996.

Ihokura, K. et Watson, J., *The stannic oxide gas sensors-Principles and applications*. CRC Press, 1994.

Jaillais, B., *Mise au point des méthodes d'analyse permettant de caractériser l'impact, sur les qualités organoleptiques d'un fromage de type pâte molle-croûte fleurie, de l'association d'*Hafnia alvei* à des ferments d'aromatisation*. Thèse, université de TOURS, 1999.

Juanola, R., Guerrero, L., Subira, D., Salvado, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A. et Antico, E., *Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **513**(1): p. 291-297.

Juanola, R., Subira, D., Salvado, V., Regueiro, J. A. G. et Antico, E., *Evaluation of an extraction method in determination of 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork*. 2002: p. 207-214.

Kaminski, E., Stawicki, S. et Wasowicz, E., *Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *penicillium* and *fungi imperfecti**. *Appl. Microbiol*, 1974. **27**(6): p. 1001-1004.

Laing, D. G. et Jinks, A., *Flavour perception mechanisms*. *Trend in Food Science and Technology*, 1996. **7**(387-389): p. 422-423.

Lopes, M., H, Barros, A., S, PASCoal Neto, C., Rutledge, D., Delgadillo, I. et Gil, A. M., *Variability of cork from portugese *Quercus suber* studied by solid-state ¹³C-NMR and FTIR spectroscopies*. *Biopolymers (biospectroscopy)*, 2001. **62**(268-277).

Lorenzo, I. M., Prerez Pavon, J. L., Fernandez Laespada, M., Garcia Pinto, C. et Moreno Cordero, B., *Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry*. *Journal of chromatography*, 2002. **945**(1-2): p. 221 - 230.

Maalouly, J., *Evaluation des performances de différentes méthodes d'analyse utilisant la Spectrométrie Infrarouge en vue de la caractérisation des betteraves*, in *Thèse INA P-G*. 2005: Paris.

MacLeod, P. et Sauvageot, F., *Bases neurophysiologiques de l'évaluation sensorielle des produits alimentaires. VI - L'olfaction*. *Les cahiers de l'ENSBANA*, 1986. **5**: p. 115-133.

Maga, J. A., *Simple phenol and phenolic compounds in food flavours*. Crit. rev. Sc. Food, 1978. **10**: p. 323-372.

Marisa, K., Taylor, M. Y., Butzke, C. E. et Ebeler, S. E., *Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(6): p. 2208-2211.

Marsili, R. T., *SPME-MS-MVA as an Electronic Nose for the study of off-flavors in milk*. Journal of agricultural and food chemistry, 1999. **47**: p. 648-654.

Marsili, R. T., *Shelf-life prediction of processed milk by Solid-Phase Microextraction, mass spectrometry and Multivariate Analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**: p. 3470-3475.

Martens, H. et Martens, M., *Modified jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modeling (PLS R)*. Food quality preference, 2000. **11**: p. 5-16.

Martens, M. et Martens, H., *Partial Least Squares*. Statistical procedures in food research, 1986: p. 293-359.

Mathieu, L., *Les goûts de bouchon dans les vins mousseux*. Rev. Viticulture, 1900. **1**: p. 273-278.

Maujean, A., Millery, P. et Lemaesquier, H., *Explications biochimiques et métaboliques de la confusion entre goût de bouchon et goût de moisi*. Revue française d'oenologie, 1985. **99**: p. 55-62.

Mendes, M. A., Sparrapan, R. et Eberlin, M. N., *Headspace membrane introduction mass spectrometry for trace level analysis of VOCs in soil and other solid matrixes*. Analytical Chemistry, 2000. **72**: p. 2166-2170.

Mielle, P., *Une technique de pointe au service de la qualité aromatique*. Le Technoscope de Biofutur, 1998. **174**: p. 2-10.

Nicolas-Saint Denis, C., *Potentialités des capteurs de gaz pour répondre à des problèmes industriels de contrôle qualité sur des critères olfactifs*, in *Thèse INA P-G*. 1999.

Nitz, S., *Elektronische Nasen Eine neue Technik zur Geruchserfassung und -bewertung?* Advances in food sciences, 2000. **22**(3-4): p. 107 - 117.

Pankow, J. F., *Technique for removing water from moist headspace and purge gases containing volatile organic compounds. Application in the purge with whole-column cryotrapping (P/WCC) method.* Environmental Science and Technology, 1991. **25**: p. 123-126.

Pearce, T. C. et Gardner, J. W., *Predicting organoleptic scores of sub-ppm flavour notes. Part 1. Theoretical and experimental details.* Analyst, 1998. **123**: p. 2047-2055.

Pereira, C. S., Marques, J. J. F. et San Romao, M. V., *Cork Taint in Wine: Scientific Knowledge and Public Perception -- A Critical Review.* Critical Reviews in Microbiology, 2000. **26**(3): p. 147-162.

Pérès, C., Begnaud, F. et Berdague, J.-L., *Fast characterization of Camembert cheeses by static headspace-mass spectrometry.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2002a. **87**(3): p. 491-497.

Pérès, C., Begnaud, F., Eveleigh, L. et Berdague, J.-L., *Fast characterization of foodstuff by headspace mass spectrometry (HS-MS).* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(11): p. 858-866.

Pérès, C., Denoyer, C., Tournayre, P. et Berdagué, J. L., *Fast characterization of cheeses by dynamic headspace-mass spectrometry.* Anal. Chem, 2002b. **74**: p. 1386-1392.

Pérès, C., Viallon, C. et Berdagué, J. L., *Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization of cheeses.* Anal. Chem, 2001. **73**: p. 1030-1036.

Pigotti, J. R., *Statistical procedures in food research.* Elsevier Applied Science, 1986.

Pilar Marti, M., Boqué, R., Busto, O. et Guash, J., *Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages.* Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(1): p. 57-66.

Pilar Marti, M., Busto, O. et Guash, J., *Application of headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing.* Journal of Chromatography A, 2004. **1057**: p. 211-217.

Pillonel, L., Bosset, J. O. et Tabacchi, R., *Data transferability between two MS-based electronic noses using processes cheeses and evaporated milk as reference materials.* Eur Food Res Technol, 2002a. **214**: p. 160-162.

Pillonel, L., Bosset, J. O. et Tabacchi, R., *Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 2002b. **35**(1): p. 1-14.

Priser, C., Etievant, P. X., Nicklaus, S. et Bruno, O., *Representative champagne wine extracts for GC olfactometry analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **45**: p. 3511-3514.

Rapp, A., *Foreign and undesirable flavours in wine*. Les acquisitions récentes en chromatographie du vin; tec et doc. Lavoisier ed Paris, 1993: p. 151-173.

Riboulet, J.-M. et Alegoet, C., *Aspects pratiques du bouchage des vins*. Collection avenir oenologie. 1986.

Rigaud, J., Issanchou, S., Sarris, J. et Langlois, D., *Incidence des composés volatils issus du liège sur le "goût de bouchon" des vin*. science des aliments, 1984. **4**: p. 81-93.

Riu, M., Mestres, M., Busto, O. et Guasch, J., *Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection*. Journal of Chromatography A, 2002. **977**(1): p. 1-8.

Rocha, S., Delgadillo, I. et Ferrer Correia, A. J., *GC-MS study of volatils of natural and microbiologically attacked cork from Quercus suber L*. J. Agric. Food Chem, 1996. **44**: p. 865-871.

Rocha, S., Delgadillo, I., Ferrer Correia, A. J., Barros, A. et Wells, P., *Application of an electronic aroma sensing system to cork stopper quality control*. J. Agric. Food Chem, 1998. **46**.

Rocha, S., Goodfellow, B., J, Neto, C., P et Gill, A., *Enzymatic isolation and structural characterization of polymeric suberin of cork from Quercus suber*. International Journal of Biological Macromolecules, 2001. **28**: p. 107-119.

Saevels, S., Lammertyn, J., Berna, A. Z., Veraverbeke, E. A., Di Natale, C. et Nicolai, B. M., *An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life*. Postharvest Biology and Technology, 2004. **31**(1): p. 9-19.

Santos, J. P., Arroyo, T., Aleixandre, M., Lozano, J., Sayago, I., Garcia, M., Fernandez, M. J., Ares, L., Gutierrez, J. et Cabellos, J. M., *A comparative study of sensor array and GC-MS: application to Madrid wines characterization*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2004. **102**(2): p. 299-307.

Schaller, E., Bosset, J. O. et Escher, F., *'Electronic Noses' and Their Application to Food*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1998. **31**(4): p. 305-316.

Schaller, E., Zenhäusern, S., Zesiger, T., Bosset, J. O. et Escher, F., *Use of the preconcentration techniques to MS-based "electronic nose"*. Analisis, 2000. **28**: p. 743-749.

Shermer, H., *An electronic nose : a sensitive and discriminating substitute for a mammalian olfactory system*. IEE Proceedins, 1990. **137**(3): p. 197-201.

Shirey, R. E., *Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatleanalytes using solid-phase microextraction*. Journal of chromatographic science, 2000. **38**(7): p. 279-288.

Sides, A., Robards, K. et Helliwell, S., *Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(5): p. 322-329.

Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T. et Goldberg, M. D., *Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**: p. 1032-1039.

SSHA, *Evaluation Sensorielle, manuel méthodologique*. Tec et Doc Lavoisier, 1998. **2 ème édition, Paris**: p. 353.

Stone, J., V, *Independent Component analysis A tutorial Introduction*, ed. A Bradford Book. 2004, London.

Strike, D., J, Meijerink, M., G, H et Koudelka-Hep, M., *Electronic noses - A mini review*. Journal of Analytical Chemistry, 1999. **364**: p. 499-505.

Tanner, H. et Zanier, C., *2,4,6 - Trichloroanisol : Eine dominierende komponente des korkgeschmackes*. Schweiz. Zeitchr. Obst Weinbau, 1981. **117**: p. 97-103.

Valero, E., Miranda, E., Sanz, J. et Martinez-Castro, I., *Automatic Thermal Desorption in GC analysis of dairy products volatiles*. Chromatographia, 1997. **44**: p. 59-64.

Vas, G. et Vékey, K., *Solid-Phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of mass spectrometry, 2004. **39**: p. 233-254.

Vigne et Vin publications internationales (Bordeaux, F., ed. *Le bouchon Choix et contrôle*. ed. Rabion, P. 2002. 74.

Vinaixa, M., Vergara, A., Duran, C., Llobet, E., Badia, C., Brezmes, J., Vilanova, X. et Correig, X., *Fast detection of rancidity in potato crisps using e-noses based on mass spectrometry or gas sensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **106**(1): p. 67-75.

Vivas, N., Bourgeois, G., Saint Cricq de Gaulejac, N. et Glories, Y., *Arômes et Précurseurs D'arômes du Bois De Chêne de Tonnellerie*. Analisis, 1997. **25**(6).

Wold, S., A, Wold, H. et Dunn, W. J., *The collinearity problem in linear regression, The partial least squares approach to generalized inverses*, *SIAM. J. Sci. Stat. Comput.*, 1984. **5**: p. 735-743.

Wold, S., Esbensen, K. et Geladi, P., *Principal Component Analysis*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1987. **2**: p. 37-52.

Wold, S., Sjöström, M. et Eriksson, L., *PLS -regression: a basic tool of chemometrics*. Chemometr. intell. lab. syst, 2001a. **58**: p. 109-130.

Wold, S., Trygg, J., Berglund, A. et Antti, H., *Some recent developments in PLS modeling*. Chemometrics and intelligent laboratory systems, 2001b. **58**: p. 131-150.

Zalacain, A., Alonso, G. L., Lorenzo, C., Iniguez, M. et Salinas, M. R., *Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint*. Journal of Chromatography, 2004. **1033**(1): p. 173-178.

Résumé

Cette thèse traite des possibilités d'utilisation de deux techniques d'espace de tête – spectrométrie de masse (DHS-MS et SPME-MS) pour la caractérisation rapide des composés volatils et semi-volatils du liège œnologique dans le cadre d'applications « origine contrôlée » et « contrôle qualité » des bouchons basée sur leur critères olfactifs. Les étapes préliminaires nécessaires à la mise au point du DHS-MS et de la SPME-MS ont permis de déterminer les paramètres de l'analyse selon des critères basés sur la simplicité de mise en œuvre, la rapidité de l'analyse par rapport à des méthodes classiques (GC-MS et l'analyse sensorielle) et la stabilité du système évaluée par le coefficient de variation et par une analyse de variance. Ces deux techniques ont été mises en œuvres suivant deux axes d'études distincts :

➤ Le DHS-MS : le potentiel discriminant de cette technique a été évalué sur des échantillons de rondelles de liège miroirs à travers deux applications (discrimination de l'origines géographique des échantillons et discrimination des échantillons présentant des intensités croissantes d'odeur de moisi). Les méthodes d'analyses multivariées (ACP et PLS) employées aux traitement des résultats se sont avérées efficaces. Cependant, le traitement des données a montré que l'information chimique spécifique aux différences entre les échantillons peut être masquée ou noyée par les spectres de masses des composés non caractéristiques ou présents en grande quantité dans l'espace de tête du DHS-MS. La filtration des données peut alors être une solution permettant de mieux cibler l'information discriminante. Par ailleurs, les empreintes spectrales des échantillons analysés à des périodes différentes peuvent contenir une source de variabilité entraînant une baisse du pouvoir prédictif du modèle. Dans ce cas une remise à jour du modèle, présente alors une solution efficace à ce problème.

➤ Le SPME-MS : le potentiel discriminant de cette technique a été évalué sur des échantillons de planches de liège brutes à travers une étude de discrimination de l'origine géographique des échantillons. Le traitement des résultats a montré que ce couplage permet de distinguer facilement les lièges africains des lièges ibériques. Cependant, nous n'avons pas pu accéder à l'information discriminante entre les échantillons ibériques.

Avec des résultats de discrimination encourageants et des durées d'analyses relativement courtes de 27 et de 12 minutes par échantillon, le DHS-MS et la SPME-MS ont toutefois montré que leur utilisation présentaient des limites et des difficultés que nous avons tenté de définir et de discuter tout au long de ce travail.

Abstract

Abstract

This thesis work deals with the possibilities of using two techniques of headspace – mass spectrometry (DHS-MS and SPME-MS) to the characterization of the origin and the quality of cork wine stoppers by the analysis of their volatile and semi-volatile fraction.

The preliminary stages necessary for the implementation of DHS-MS and SPME-MS allowed the determination of the parameters of the analysis according to the following criteria : simplicity, speed of the analysis compared with classical techniques (GC-MS and sensory analysis) and the stability of the system as evaluated by the coefficient of variation and an analyse of variance. These two techniques were then used in two distinct directions of studies:

➤ DHS-MS: The potential of this technique was assessed on samples of champagne stoppers through two discrimination studies (origin and the quality control). The multivariate analysis used (ACP and PLS) were effective for the exploitation of the results. However, the data treatments showed that the chemical information related to the differences between the samples can be masked by mass spectral peaks of the non characteristics compounds or of the compounds present in large amounts in the headspace of DHS-MS. Data filtration can then be a solution to better target the discriminant information. In addition, fingerprints of the sample analysed at different periods may be a source of variability that decreases the predictive power of the statistical model. In this case, the update of the model offers an efficient solution to the problem.

➤ The SPME-MS: The potential of this technique was assessed on samples of cork boards through a study of the geographical discrimination of the samples. The results showed that the technique gave a clear separation of the African from the Iberic samples.

Despite having relatively short analysis times of 27 and 12 min per samples, DHS-MS and SPME-MS present limitations and difficulties that we have tried to define and discuss throughout this work.