



UNIVERSITÉ SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



N° d'ordre :208/2019

Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Techniques »
Formation Doctorale « Ressources Naturelles, Environnement et Santé »

THÈSE

Présentée par

Said SOUHASSOU

Pour l'obtention du grade de

Docteur

Spécialité : Chimie Appliquée
Option : Agroalimentaire-Chimimétrie

**CONTRÔLE DE LA QUALITÉ ET DE L'AUTHENTICITÉ DU LAIT
PAR L'APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE IR-TF COUPLÉE
AUX OUTILS CHIMIOMETRIQUES : CAS DU LAIT DE VACHE ET
LAIT DE CHAMELLE**

Soutenue le : 04 Mai 2019 devant la commission d'examen :

Pr B. MERNARI	Professeur à l'Université Sultan Moulay Slimane Béni Mellal	Président
Pr A. GORFTTI	Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal	Rapporteur
Pr A. HAFID	Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal	Rapporteur
Pr A. SAHIBED-DINE	Professeur à la Faculté des Sciences El Jadida	Rapporteur
Pr D. CHARQUAOUI	Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Marrakech	Examineur
Pr A. OUSSAMA	Professeur à l'Ecole Supérieure de Technologie Béni Mellal	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Monsieur **A. OUSSAMA** pour sa confiance et son encadrement tout au long de cette thèse. Qu'il soit remercié pour sa disponibilité, sa patience et ses encouragements. C'est grâce à ses qualités et son encadrement, que cette expérience a été agréable.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur **B. MERNARI**, Professeur à l'Université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal, à Monsieur **A. HAFID**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, à Monsieur **A. GORFTTI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, à Monsieur **A. SAHIBED-DINE**, Professeur à la Faculté des Sciences d'El Jadida et à Monsieur **D. CHARQUAOUI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger cette thèse.

Je remercie les membres d'équipe du Laboratoire de Spectro-Chimimétrie et Environnement (**LSCAE**) pour le partage et les échanges, et plus particulièrement mes collègues **M. EL BESSBASI** et **A. HIRRI**, leur aide et leur soutien étaient précieux tout le long de cette thèse.

Également, je remercie les membres de ma famille leur patience et leur soutien surtout dans les moments les plus difficiles. Et plus particulièrement mon père **SOUHASSOU Khouya** qui a voulu toujours que j'aille plus loin dans mes études et c'est grâce à lui que ce travail a vu le jour.

Enfin, je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RESUME

L'authenticité du lait est nécessaire pour donner un jugement sur ses qualités nutritionnelles. Et c'est dans le but d'authentifier le lait de chamelle que la spectroscopie IR-TF couplée aux méthodes chimiométriques a été appliquée pour une détermination quantitative rapide et non destructive de l'adultération du lait de chamelle par le lait de vache. Des mesures ont été faites sur du lait de chamelle qui ont été falsifiées avec des concentrations variables de lait de vache.

Une méthode de régression PLS a été appliquée pour prédire le lait de vache ajouté dans le lait de chamelle en fonction de la modélisation des mesures d'absorption spectrale MIR-TF. Les spectres ont été exploités par la régression PLS avec et sans prétraitement. Les tests des différents prétraitements ont permis de distinguer le traitement spectral qui améliore les performances de la régression PLS.

Dans l'objectif d'étudier un autre aspect de fraude de lait, une nouvelle méthode a été appliquée en utilisant la spectroscopie MIR-TF couplée à la régression PLS. L'application de cette procédure a permis la quantification de l'adultération du lait de vache avec le saccharose. Le recours au prétraitement des spectres a permis d'améliorer les performances du modèle élaboré.

Les performances des modèles élaborées, dans les deux cas, ont été améliorées par l'utilisation d'une plage spectrale réduite. Les validations externes de ces méthodes, avec des échantillons non compris dans la gamme d'étalonnage, ont donné des résultats satisfaisants en termes d'erreurs relatives et limite de détection.

Les analyseurs de routine du lait sont des équipements basés sur l'utilisation de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques. Ils fournissent une multitude de paramètres en un temps très courts (quelques secondes). Ils assurent une cadence très élevée surtout pendant les programmes de contrôles de qualité ou de paiement du lait. Ce genre de programme implique un grand nombre d'échantillons et pour préserver leur qualité pendant la durée qui sépare le prélèvement de l'analyse, les conservateurs sont largement utilisés.

Parmi, les analyses assurées par ces équipements on trouve le point de congélation, un paramètre qui donne une indication directe sur le mouillage du lait. Dans le but d'étudier les effets des techniques de conservation sur les performances de l'analyseur du lait, cinq techniques de conservation en été testées en variant les pourcentages d'eau ajoutés. Et les résultats obtenus ont permis de définir les méthodes de conservation qui peuvent être utilisées sans que les interprétations des résultats soient erronées. L'usage des autres méthodes de conservation nécessite une confirmation par la méthode officielle avant de donner tout jugement sur la fraude du lait.

Les résultats de cette étude ont démontré que la spectroscopie MIR-TF associée à la chimiométrie pourrait être utilisée comme méthode rapide et non destructive pour l'authentification du lait. Que ce soit pour détecter la présence du lait d'une autre espèce ou d'une substance qui n'entre pas, normalement, dans sa composition initiale. De plus, les équipements basés sur la spectroscopie IR-TF montrent de grandes performances même avec l'usage de conservateurs.

Mot clés : Spectroscopie infrarouge, méthodes chimiométriques, fraude, authentification, contrôle de qualité, adultération, lait de vache, lait de chamelle.

ABSTRACT

The authenticity of milk is necessary to give a judgment on these nutritional qualities. And to authenticate camel milk, Fourier Transform Infrared Spectroscopy coupled with chemometrics methods was applied for a rapid and non-destructive quantitative determination of milk camel adulteration. Measurements were made on camel milk that were falsified with varying concentrations of cow's milk.

A partial least square regression method was applied to predict cow's milk added in camel milk based on the modeling of spectral MIR-TF absorption measurements. The spectra were exploited by partial least squares regression without pretreatment and with different pretreatment modes. The tests of the different pretreatments made it possible to distinguish the spectral treatment which improves the performances of the partial least square regression.

And to investigate another aspect of milk fraud, a new method was applied using Fourier Transform Mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares regression. The application of this procedure allowed the quantification of adulteration of cow's milk with sucrose. The use of pretreatment spectra has improved the performance of the model developed.

The performance of the models developed in both cases was also improved using a reduced spectral range. The external validations of these methods, with samples not included in the calibration range, gave satisfactory results in terms of relative errors and detection limit.

Routine milk analyzers are equipment based on the use of infrared spectroscopy coupled with chemometric methods. They provide a multitude of parameters in a very short time (a few seconds). They also provide a very high rate especially during quality control or payment programs. This type of program involves many samples and to preserve their quality for the time that separates the sample from the analysis, the preservatives are widely used.

Among the analyzes performed by this equipment is the freezing point, a parameter that gives a direct indication of the wetting of the milk. And to study the effects of conservation techniques on milk analyzer performance, five conservation techniques were tested by varying the percentages of water added. And the results obtained made it possible to define the methods of conservation which can be used without the misinterpretations of the results. The use of other methods of preservation requires confirmation by the official method before giving any judgment on milk fraud.

The results of this study demonstrated that Fourier Transform Mid-infrared spectroscopy combined with chemometrics could be used as a fast, non-destructive method for milk authentication. Whether to detect the presence of milk of another species or a substance that does not normally enter its original composition. In addition, equipment based on Fourier Transform Infrared spectroscopy, shows great performance even with the use of preservatives.

Keywords: Infrared spectroscopy, chemometrics, fraud, authentication, quality control, adulteration, cow's milk, camel's milk.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : L'analyse en composantes principales
ANP : L'azote non-protéique
AOP : L'appellation d'origine protégée
ATR : La réflexion totale atténuée
Cal : Calibration
CPs : les composantes principales
EST : L'Extrait sec total
F.I.L : La Fédération Internationale de Lait
FAO : L'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FP : Le point de congélation
HCA : La Classification hiérarchique ascendante
IDF : La Fédération internationale du lait
IR : La spectroscopie infrarouge
IR-TF : La spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier
ISO : L'organisation internationale de normalisation
LIR : La spectroscopie lointain infrarouge
LOD : La limite de détection
MAT : Matière azotée totale
MC : Le centrage par la moyenne
MCT : Mercure Cadmium Tellure
MFGM : Membrane des globules gras « Milk fat globule membrane »
MG : Matière grasse
MIR : La spectroscopie moyen infrarouge, : spectroscopie moyen infrarouge
MIR-TF : la spectroscopie moyen infrarouge a transformé de Fourier
MSC : Correction de Scatter multiplicatif
NIPALS : Non-linear Iterative Partial Least-Squares
NIR : La spectroscopie proche infrarouge "Near infrared"
°D : Degré Dornic
OMS : L'Organisation mondiale de la Santé
PCC : Le phosphate de calcium colloïdal
PCR : La régression sur Composantes Principales
PIB : Produit intérieur brut
PIR : La spectroscopie proche infrarouge
PLS : La régression des moindres carrés partiels (partial least square)
PLS-DA : Partial least square discriminant analysis
Predi. : La valeur de prédiction
R : Le coefficient de corrélation
R²cv : Le coefficient de détermination de la validation croisée
R²p : Le coefficient de détermination de prédiction
RE : l'erreur relative de prédiction
Ref. : La valeur de référence
RMSEC : L'erreur quadratique de l'étalonnage
RMSECv : L'erreur quadratique de validation croisée
RMSEP : L'erreur standard de prédiction
SB-ATR : La réflectance totale atténuée à un seul rebond
SNV : Standard Normal Variate
Sr : L'écart type de répétabilité
UHT : Ultra haute température
Val : La validation
WPR : Sans agent de conservation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Principales propriétés physiques du lait.....	20
Tableau 2 - Composition globale de quelques espèces de mammifères g/100g de lait.	24
Tableau 3 - Constituants lipidiques de la matière grasse du lait de vache et leur localisation (g/100g de matière grasse) [26].....	26
Tableau 4 - Distribution des principaux acides gras du lait en %.	28
Tableau 5 - Concentration moyenne du lait en protéine [31].....	30
Tableau 6 - Azote non-protéique du lait de vache [33].	32
Tableau 7 - Constituants majeurs des matières salines du lait (g/L).....	34
Tableau 8 - Principaux oligoéléments du lait.	35
Tableau 9 - Concentrations en vitamines du lait de vache [26].	36
Tableau 10 - Les paramètres de l'étalonnage et de la prédiction à l'aide de la régression PLS sans prétraitements et avec différentes méthodes de prétraitement.	86
Tableau 11 - Les paramètres de la validation externe à l'aide de la régression PLS sans prétraitements et avec différentes méthodes de prétraitement.....	90
Tableau 12 - Paramètres statistiques obtenus par PLS modélisations lors de la calibration.	96
Tableau 13 - Paramètres statistiques obtenus par PLS modélisations du saccharose ajouté au lait, lors de la validation externe.....	97
Tableau 14 - Paramètres statistiques obtenus par PLS modélisations données MIR dans la gamme spectrale de 1800 à 920 cm ⁻¹ avec la première dérivée de Savitsky Golay comme prétraitement.	98
Tableau 15 - Comparaison des valeurs de références vs prédites des modèles de tests de validation externe.....	99
Tableau 16 - Moyennes des moindres carrés du point de congélation (m°C) et des écarts-types de répétabilité (Sr et Sr%) pour chacune des 40 conditions analytiques examinées avec les méthodes instrumentales (IM) et de référence (RM).	109
Tableau 17 - Coefficients de régression (b), d'interception (a) et de R ² basés sur des analyses de régression pour des valeurs de point de congélation (m°C) obtenues par les méthodes de référence et de MilkoScan FT2 dans des conditions d'analyse différentes.....	110
Tableau 18 - Composition des échantillons de lait du réservoir en vrac.	111
Tableau 19 - Analyse de la variance des variations du point de congélation.....	111
Tableau 20 - Les moindres carrés signifient le point de congélation en fonction de l'interaction de la méthode d'analyse et le conservateur.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Composition globale du lait de vache.	24
Figure 2 - Structure d'un globule de matière grasse adaptée de (Raynal-Ljutovac et al., 2011).	25
Figure 3 - Formation d'un triglycéride.	26
Figure 4 - Schéma de la micelle et la sous-micelle de caséine.	31
Figure 5 - Structure moléculaire du lactose.	33
Figure 6 - Spectre électromagnétique[62].	44
Figure 7 - Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique.	45
Figure 8 - Modes de vibrations moléculaires.	48
Figure 9 - Exemples de bandes d'absorption dans le proche infrarouge.	52
Figure 10 - Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge dispersif.	53
Figure 11 - Schéma d'un spectromètre avec interféromètre de Michelson.	55
Figure 12 - Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur diamant.	57
Figure 13 - Graphique d'un dendrogramme.	64
Figure 14 - Etapes de développement d'une méthode d'analyse.	69
Figure 15 - Les spectres d'absorption MIR du lait de chamelle pur (bleu) et du lait de vache pur (rouge) dans la gamme spectrale de 3600-920 cm^{-1}	76
Figure 16 - ACP sans prétraitement.	78
Figure 17 - ACP avec centrage par moyenne.	78
Figure 18 - ACP avec Déviation Normale Standardisée (SNV).	79
Figure 19 - ACP avec Gap Segment.	79
Figure 20 - ACP avec Savitsky-Golay.	80
Figure 21 - ACP avec Norris Gap.	80
Figure 22 - Analyse en composante principale des spectres MIR-TF des échantillons de lait de chamelle fraudé avec le lait de vache.	81
Figure 23 - Graphique du chargement de la première PC du modèle ACP sans prétraitement du spectre dans la plage allant de 3000 à 920 cm^{-1}	82
Figure 24 - Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	83
Figure 25 - Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec le centrage par moyenne sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	84
Figure 26 - Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec la SNV sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	84
Figure 27 - Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec la dérivée Norris Gap sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	85
Figure 28 - Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec la dérivée Gap Segment sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	85
Figure 29 - Les valeurs de référence vs les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec la dérivée de Savitzky-Golay sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1}	85
Figure 30 - Les valeurs de références versus prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS sans prétraitement.	87
Figure 31 - Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitements avec le centrage par moyenne.	87
Figure 32 - Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec Déviation Normale Standardisée (SNV).	88
Figure 33 - Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajoutée au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la première dérive de Savitzky-Golay.	88
Figure 34 - Les valeurs de référence vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la dérivée Gap Segment.	89

Figure 35 - Les valeur de références vs prédites de lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la dérivée Norris Gap	89
Figure 36 - Spectres moyen infrarouge du lait cru sans ajout du saccharose (bleu) et du lait avec ajout du saccharose.	94
Figure 37 - valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée (rouge) ; quand PLS est appliqué sur les données spectrales dérivée dans la zone 3100-920 cm ⁻¹	97
Figure 38 - Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 1).	100
Figure 39 - Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 2).	100
Figure 40 - Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 3).	101
Figure 42 - Moindres carrés des points de congélation (milliCelsius) pour la méthode Milkoscan FT2 en fonction de l'interaction eau ajoutée et l'agent de conservation (WPR=Sans agent de conservation ; BCR20=Bichromate de potassium avec 20 µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; BCR40=Dichromate de potassium avec 40µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; PER20=Peroxyde avec 20µL/100mL ; PER40 = Peroxyde avec 40µL/100mL).	112
Figure 41 - Moindres carrés des points de congélation (milliCelsius) pour la méthode de référence en fonction de l'interaction eau ajoutée et l'agent de conservation (WPR=Sans agent de conservation ; BCR20=Bichromate de potassium avec 20 µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; BCR40=Dichromate de potassium avec 40µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; PER20=Peroxyde avec 20µL/100mL ; PER40 = Peroxyde avec 40µL/100mL).	113

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUME	3
ABSTRACT	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	12
Chapitre 1 : caractéristiques et compositions du lait.	16
I. Introduction	16
II. Généralités.....	16
II.1. Aperçu historique.....	16
II.2. Filière Lait et produits laitiers au Maroc	17
II.3. Politique laitière au Maroc.....	17
II.4. Evolution de la consommation du lait.....	18
III. Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache	19
III.1. Définition du lait.....	19
III.2. Caractéristiques organoleptiques	19
III.3. Propriétés physicochimiques du lait	20
III.3.1. Densité	20
III.3.2. Acidité du lait	21
III.3.3. Point de congélation	21
III.3.4. Point d'ébullition	22
III.3.5. Conductivité électrique	22
III.3.6. La tension superficielle.....	22
III.3.7. Viscosité	23
IV. Composition du lait	23
IV.1. Eau.....	24
IV.2. Matière grasse.....	25
IV.2.1. Les triglycérides.....	26
IV.2.2. Les phospholipides	27
IV.2.3. La fraction insaponifiable	27
IV.3. Protéines	29
IV.3.1. Caséines.....	29
IV.3.2. Protéines du lactosérum	31
IV.3.3. Azote non-protéique (ANP).....	31
IV.4. Lactose	32
IV.5. Minéraux et Oligoéléments.....	33
IV.6. Vitamines.....	35
IV.7. Enzymes.....	36
IV.8. Variation de la composition du lait	37
IV.8.1. Variation au stade de l'animal.....	37
IV.8.2. Variation au cours du traitement du lait	38
IV.9. Composition microbiologique du lait	39
Chapitre 2 : la spectroscopie infrarouge et chimométrie.	42

I. Introduction	42
II. La Spectroscopie Infrarouge.....	42
II.1. Historique	42
II.2. Bases de la spectroscopie infrarouge.....	43
II.2.1. Natures et propriétés des radiations infrarouges	43
II.2.2. Principe de la spectroscopie infrarouge.....	45
II.2.3. Fondement théorique de la spectroscopie infrarouge.....	46
II.2.4. Vibrations des molécules	46
II.2.4.1. Le modèle diatomique	48
II.2.4.2. Modèle poly-atomique	49
II.3. Spectroscopie Moyen Infrarouge (MIR)	49
II.3.1. Caractéristique de la spectroscopie moyen infrarouge	49
II.3.2. Interprétation d'un spectre moyen infrarouge	49
II.4. La spectroscopie proche infrarouge (PIR)	51
II.4.1. Bandes harmoniques et bandes de combinaison dans le proche infrarouge	51
II.4.2. Absorptions spécifiques dans le proche Infrarouge (PIR)	51
II.4.3. Avantages et inconvénients de la spectroscopie PIR	52
II.5. Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF).....	52
II.5.1. Spectromètre dispersif.....	52
II.5.2. Spectromètre non dispersif.....	53
II.5.2.1. Description d'un spectromètre IR-TF.....	53
II.5.2.2. Fonctionnement du spectromètre IR-TF.....	54
II.5.2.3. Avantages et limites de la spectroscopie IR-TF.....	55
II.5.2.4. Réflexion totale atténuée (ATR)	56
II.6. Analyse des données infrarouges.....	57
III. La chimiométrie	58
III.1. Prétraitements des données	58
III.1.1. Données centrées.....	59
III.1.2. Données centrées normées (ou centrées réduites).....	59
III.1.3. Centrage par colonne	59
III.1.4. Centrage par ligne	59
III.1.5. Dérivées.....	60
III.1.6. Correction Multiplicative de diffusion (MSC)	60
III.1.7. Déviation Normale Standardisée «Standard Normal Variate : SNV»	61
III.2. Méthodes exploratoires (non-supervisées)	61
III.2.1. Analyse en composantes principales : ACP	61
III.2.2. Classification hiérarchique ascendante (HCA) : Analyse de regroupement	63
III.3. Méthodes prédictives (supervisées)	64
III.3.1. Régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares : PLS)	64
III.3.2. Partial least square discriminante (PLS-DA)	65
III.4. Paramètres d'évaluation de la qualité des modèles	66
III.4.1. Modèle de calibration	66
III.4.2. Validation croisée totale	66
III.4.3. Validation externe	67
III.5. Logiciels de traitement des données spectrales	68
III.6. Développement d'une méthode d'analyse	68
IV. Les applications de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimométriques	70
V. Conclusion.....	71

Chapitre 3 : la détection de l'adultération du lait de chamelle par le lait de vache en utilisant la spectroscopie FT-IR couplée à des méthodes chimométriques..... 72

I. Introduction	72
------------------------------	-----------

II. Matériels et méthodes	74
II.1. Echantillonnage.....	74
II.2. Analyse en moyen infrarouge (MIR)	74
II.3. Méthodes chimiométriques	75
II.3.1. Régression des moindres carrés partiels (PLS)	75
II.3.2. Paramètres statistiques.....	75
II.3.3. Logiciels	76
III. Résultats et discussion.....	76
III.1. Spectres IR-TF du lait de chamelle et de vache	76
III.2. Analyses en composantes principales (ACP)	77
III.3. Elaboration du modèle de calibration	82
III.4. Validation externe.....	86
IV. Conclusion.....	90

Chapitre 4 : détermination de l'adultération du lait par le saccharose en utilisant la spectroscopie MIR-TF et les méthodes chimiométriques. 91

I. Introduction	91
II. Matériels et méthodes	92
II.1. Echantillonnage.....	92
II.2. Analyses en moyen infrarouge (MIR)	93
II.3. Méthodes chimiométriques.....	93
III. Résultats et discussion.....	93
III.1. Spectres MIR-TF du lait	93
III.2. Elaboration du modèle de calibration	94
III.3. Validation externe.....	97
IV. Conclusion.....	101

Chapitre 5 : Evaluation de l'analyse du lait par spectroscopie MIR-TF pour déterminer le point de congélation sous différentes conditions analytiques. 103

I. Introduction	103
II. Matériels et méthodes	105
II.1. Echantillonnage.....	105
II.2. Analyses statistiques	106
III. Résultats et discussion.....	107
IV. Conclusion.....	113

CONCLUSION GENERALE..... 114

BIBLIOGRAPHIE 116

INTRODUCTION GENERALE

Les fraudes alimentaires sont une problématique qui ne date pas de nos jours. Les premiers cas de fraudes remontent aux sociétés Grecque et Romaine [1]. Les motivations des fraudes alimentaires sont purement économiques. Les fraudeurs cherchent à réaliser des gains financiers par la vente de produits ayant des qualités inférieures, au lieu de produits authentiques. L'authentification des produits alimentaires est le processus par lequel un aliment est vérifié pour se conformer à sa description préétablie et aux normes définies par des consensus nationaux et internationaux qui veillent à l'équité et la préservation de la santé des consommateurs. Pour les cas des produits agro-alimentaires, les fraudes peuvent toucher les espèces productrices, les variétés, ainsi que le contenu des produits mis sur le marché. La définition de produit authentique englobe l'origine (naturelle ou artificielle), le mode de production (sauvage ou domestique) et l'origine géographique [2].

La fraude alimentaire se fait soit par addition ou par soustraction. Pour l'addition, il s'agit de l'ajout d'une substance à faible valeur à la denrée alimentaire, c'est le cas du mouillage du lait, du mélange de la margarine au beurre laitier et l'addition du sucre au lait ou autre produit alimentaire. Cependant, la soustraction consiste à enlever une partie de la composition du produit, généralement c'est celle qui a plus de valeur. L'écémage du lait en est l'exemple concret. Un autre type de fraude est réalisé par la synthèse de produits alimentaire par des substances qui n'entrent pas normalement dans leurs compositions, comme pour les boissons alcooliques fabriquées avec de l'alcool industriel [3].

Face à ces pratiques de fraudes, et dans le but de protéger les consommateurs, la réglementation en matière de sécurité des denrées alimentaires évolue de manière continue pour englober l'ensemble de la chaîne agroalimentaire. De manière générale les textes réglementaires concernent la production primaire, la transformation industrielle, et la distribution jusqu'au consommateur. Ces textes sont mis en place dans le but d'harmoniser les exigences à l'ensemble des acteurs de la chaîne alimentaire et de fournir un produit sain et propre à la consommation. Ainsi, la réglementation met l'accent sur l'étiquetage des produits, vu son importance en termes d'information fournis aux consommateurs et de traçabilité depuis la source jusqu'à la table. Cet étiquetage doit garantir une information fiable en termes de dénomination, constituants, et origines [4]. La législation sur l'étiquetage est là pour s'assurer que les aliments sont correctement décrits. Il vise à protéger le consommateur contre la vente d'un produit inférieur avec une description fautive, en plus de protéger les commerçants honnêtes de la concurrence déloyale. L'application de cette législation garantit que les produits correctement décrits restent à la disposition du consommateur et que la confiance des consommateurs est maintenue, ce qui assure un marché pour ces aliments. Ainsi, la disponibilité de méthodes analytiques solides qui peuvent assurer l'authenticité des aliments joue un rôle fondamental dans le fonctionnement de la société moderne [5]. La fraude alimentaire existe et existera toujours. A cotée des moyens réglementaires, les moyens analytiques doivent être développés pour pouvoir lutter contre ces pratiques.

Comme déjà cité, les produits laitiers connaissent aussi ces pratiques. Pour des raisons économiques, les fraudes peuvent parfois nuire à la santé des consommateurs. Un consommateur allergique au lait de vache souffre sévèrement de la consommation du lait de chèvre ou de brebis mélangés frauduleusement au lait de vache [6]. L'authenticité du lait et des produits laitiers est d'une importance capitale pour les consommateurs et les industriels en passant par toutes les étapes du processus de production. Quel que soit le type de fraudes, la vérification de l'authenticité repose soit sur une différence fondamentale entre un produit original et un produit fraudé, soit sur une véritable connaissance de leur composition et les éventuelles variations de composition. Un produit est jugé authentique lorsque sa composition s'intègre dans les données constituées par les échantillons authentiques, et cette décision repose sur des procédures statistiques.

L'authentification des produits laitiers passe par une caractérisation des matières premières, notamment le lait cru. Cette matière première est authentifiée et qualifiée par des méthodes analytiques physico-chimiques et biochimiques. Dans la plupart des cas on fait appel à des techniques de dosage très spécifiques : c'est le cas du dosage de la matière grasse par la méthode de *Gerber*, le dosage des protéines par la méthode *Kjeldahl*. Ces méthodes de dosage classique sont généralement longues, coûteuses, et nécessitent un certain niveau de technicité des opérateurs [7], ce qui les empêche d'être des outils efficaces et efficaces pour les analyses de routines.

Pour des raisons d'efficacité en termes de contrôle et d'authentification, le contrôleur doit avoir en sa possession un ou plusieurs outils analytiques rapides, simples tout en étant fiables et moins chers. Ces outils doivent permettre au contrôleur de déterminer une multitude de critères pour décider rapidement le devenir des produits durant toutes les étapes du processus de production. C'est dans ce sens qu'intervient la spectroscopie infrarouge pour permettre la réalisation des contrôles en un temps très court (Quelques minutes suffisent).

La spectroscopie infrarouge est largement utilisée pour les analyses qualitatives et quantitatives des produits agroalimentaire [8]. En industrie laitière, les analyses de routine sont réalisées par des équipements qui se basent sur la spectroscopie infrarouge. Cette technique permet la réalisation d'une multitude de contrôles en quelques minutes. La détermination en routine de la matière grasse, des protéines, du lactose, de l'urée et de l'acide citrique est réalisée par des spectromètres moyen infrarouge (MIR) [9]. Ces paramètres sont importants dans le cadre du paiement du lait et le sont aussi dans la conduite du troupeau laitier au niveau alimentation et santé : la teneur en matière grasse et protéines sont des indicateurs de l'alimentation des vaches, et la teneur en lactose est un indicateur de mammite [10]. Un autre avantage de cette technique est qu'elle permet de suivre en ligne la qualité des produits. Les spectromètres peuvent être placés directement en salle de traite pour suivre individuellement la qualité du lait de vache au moment de la traite [11].

Les développements réalisés sur les spectromètres infrarouges permettent la caractérisation des échantillons complexes tout en réduisant les temps d'acquisition des spectres. Par le passé, ces données spectrales constituent un vrai problème à résoudre, mais avec l'aide des méthodes statistiques

multivariées, ces données deviennent une ressource riche en informations à extraire. La chimiométrie, une discipline qui fait appel aux méthodes statistiques multivariées dans le domaine de la chimie, est de plus en plus appliquée dans le domaine agroalimentaire. Dans l'industrie laitière, les applications de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques couvrent deux principaux domaines : la quantification des paramètres qualités et l'évaluation de l'authenticité des produits.

Les applications de cette technique sont nombreuses dans le secteur laitier. Leurs applications ne se limitent pas aux contrôles des produits finis mais s'intègrent aux différentes étapes du processus de fabrication. La force de cette technique est liée à sa capacité à fournir une "empreinte" caractéristique des substances chimiques ou biochimiques présentes dans l'échantillon. Pour le lait cru une méthode basée sur la spectroscopie moyen infrarouge a été reconnue comme méthode officielle pour la détermination de la matière grasse, des protéines, du lactose et de la matière sèche [12]. La détermination de ces constituants est applicable à la plupart des produits laitiers. Quant aux contrôles qualitatifs, ils se basent sur les ressemblances et les différences enregistrées dans les spectres des échantillons. Cette capacité de discrimination, réalisée par les méthodes statistique multivariées, a permis de détecter la fraude du beurre laitier par la margarine [13] et la détection rapide de la mélamine dans la poudre de lait [14].

Les travaux présentés dans cette thèse concernent le secteur laitier. Ils proposent le développement des applications de la spectroscopie moyen infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques pour le contrôle de la qualité et l'authenticité du lait cru. Ce lait, se trouvant dans les premières chaînes de l'industrie laitière, constitue la principale matière première pour cette industrie, et il est évident que la maîtrise de la qualité des produits laitiers est conditionnée par la qualité de cette matière première. Le but étant de présenter des méthodes rapides et efficaces et les proposer comme alternatives aux méthodes classiques qui nécessitent beaucoup plus de temps et un bon niveau de technicité et ce pour assurer le contrôle de l'authenticité et la qualité.

L'objectifs principal de ce travail est le développement de nouvelles applications analytiques basées sur la spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier, en association avec les méthodes chimiométriques, pour la quantification et la détection des fraudes touchant l'authenticité et la composition du lait. La fraude de l'authenticité est représentée par l'addition du lait de vache au lait de chamelle et le deuxième cas est représenté par l'addition du saccharose au lait de vache.

Ce mémoire de thèse est divisé en deux parties :

- **La première partie** est consacrée à une étude bibliographique avec un **premier chapitre** présentant quelques généralités sur le lait et un **deuxième chapitre**, où nous rappelons les généralités sur les principes de la spectroscopie infrarouge, la chimiométrie et leurs applications.
- **La seconde partie** est divisée en trois chapitres traitants les résultats de l'application de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques pour le cas du

lait de chamelle et lait de vache. **Le premier chapitre** détaille l'application de la spectroscopie MIR avec les méthodes chimiométriques pour la détection et la quantification de l'adultération du lait de chamelle par le lait de vache. **Le deuxième chapitre** traite un autre cas de fraude du lait par le saccharose. **Le troisième chapitre** étudie les performances de l'analyse du lait par la spectroscopie IR-TF, en variant les stratégies de conservation et les pourcentages d'eau ajoutée.

Chapitre 1 : caractéristiques et compositions du lait.

I. Introduction

Traditionnellement, le lait de vache est considéré comme un aliment de base dans de nombreux régimes. Pour le nouveau-né, le lait constitue un aliment complet et une source en éléments essentiels pour la croissance et le développement. Il constitue une source de nutriments comme les minéraux, les vitamines et les protéines [15]. Avec les céréales, les viandes, les légumes et les fruits, les produits laitiers sont considérés comme des aliments riches en éléments nutritifs [16]. Ils fournissent de nombreux nutriments importants pour la santé tout au long du cycle de vie, et leur consommation est aussi associée aux valeurs nutritionnelles [17].

Les avancées technologiques, réalisées dans les techniques de séparation et de conservation, ont permis de valoriser des sous-produits laitiers utilisables comme intrants dans divers secteurs industriels [18]. Ce qui marque la place prise de ce secteur dans l'économie à l'échelle internationale. Cependant, la position du secteur laitier au Maroc est très particulière ; par son rôle dans l'économie avec ces 30% de part du PIB agricole, par son rôle social avec les emplois créés dans le milieu rural et par son importance dans la sécurité alimentaire avec la satisfaction des besoins de consommation [19].

Face à une offre très diversifiée en termes de produits, les consommateurs (finaux ou intermédiaires) sont devenus plus exigeants en termes de qualité. Ainsi, la qualité et l'authenticité du lait sont des soucis partagés par tous les maillons de la chaîne, depuis le producteur jusqu'au consommateur final. Le long de ce chemin, il faut impérativement s'assurer de la qualité et de la salubrité des produits laitiers avant de les servir pour la consommation.

II. Généralités

II.1. Aperçu historique

La consommation du lait par l'Homme date de la préhistoire dès qu'il a su domestiquer les animaux. Ceci date du Néolithique (vers 8700 avant J.C.), notamment dans le Proche-Orient où apparaissent les premiers indices de l'élevage et de la consommation du lait. Les traces archéologiques, traces chimiques de résidus laitiers dans des contenants, étude des squelettes des animaux, gravures rupestres représentant des scènes de traite constituent des données scientifiques qui témoignent de la consommation et l'exploitation laitière par les hommes du néolithique. Vers 2500 avant Jésus-Christ en Mésopotamie, des données scientifiques (traces archéologiques et écrites : plaquettes) révèlent l'existence d'une laiterie. Pour des raisons évidentes de transport et de conservation, le lait et les

produits laitiers ont été consommés frais, pendant longtemps, par les éleveurs ou dans leur région de production.

Au début du 12^{ème} siècle, on retrouve le lait mentionné comme indispensable dans l'alimentation et utilisé comme médicament (*galactothérapie*), pour les enfants, les malades et les vieillards. Au 17^{ème} siècle, la consommation dépasse le cadre des campagnes et augmente par la présence des vaches dans les villes. Au 18^{ème} siècle de nombreuses préparations ont été faites à base de lait, beurre et crème. Du milieu du 18^{ème} et 20^{ème} siècle, la consommation des produits laitiers a augmenté progressivement et celle du lait a doublé [20].

Les progrès scientifiques du 20^{ème} siècle, réalisés en matière de génie génétique et de zootechnie, ont apporté des progrès considérables dans les rendements laitiers.

II.2. Filière Lait et produits laitiers au Maroc

Par sa contribution au PIB agricole (30%), l'élevage joue un rôle important dans l'économie du pays. Le secteur assure aussi de l'emploi en milieu rural et subvient aux besoins de consommation en produits animaux. L'élevage laitier comme une des principales composantes de ce secteur est représenté par deux systèmes d'exploitation. Le premier est un système intensif pratiqué dans les zones irriguées du pays, il se caractérise par une forte abondance des ressources fourragères, la prédominance des races bovines à haut potentiel génétique (70%) et un fort taux de commercialisation de la production laitière (60 – 70%). Le deuxième système est dit mixte (lait et viande), basé sur une alimentation à base de concentré et des sous-produits céréaliers. Ce système est très présent autour des grandes agglomérations urbaines et des zones à pluviométrie favorable.

La production nationale en lait et produits laitiers satisfait environ 90% de la demande en consommation. Cependant, cette demande reste inférieure aux besoins recommandés par les standards nutritionnels recommandés par les Organisations Internationales (FAO et OMS).

II.3. Politique laitière au Maroc

Au début des années 1970 les orientations stratégiques de l'Etat ont visé la consolidation de la sécurité alimentaire en produits laitiers. Les programmes élaborés ont eu comme objectif majeur l'amélioration de l'autosuffisance et l'augmentation du niveau de consommation des produits laitiers de 0,1 à 0,33 litre de lait par personne et par jour entre 1975 et 2000. Pour atteindre cet objectif, les principaux axes d'amélioration étaient [19] :

- L'amélioration génétique du cheptel bovin par l'insémination artificielle et le croisement avec des animaux de races améliorées ;
- L'intensification des mesures destinées à améliorer la santé animale et le contrôle sanitaire des produits laitiers ;

- L'amélioration des ressources fourragères et la constitution de stocks d'urgence pour l'alimentation animale ;
- L'implantation de centres de collecte de lait à proximité des zones de production ;
- L'incitation à l'investissement pour la mise en place et le développement d'unités de transformation du lait.

Les résultats ont permis une augmentation de la production laitière en passant de 480 millions de litres en 1975 à 1,1 milliard de litres en 1999. En revanche, la consommation des produits laitiers était en deçà des attentes. Ceci a conduit l'Etat à élaborer un second plan laitier pour la période 2000-2020. Du fait que le potentiel des vaches laitières n'a pas été extériorisé, ce plan a mis l'accent sur l'encouragement de la spécialisation des régions en systèmes de productions liés aux ressources alimentaires disponibles, la poursuite de l'amélioration génétique du cheptel, l'amélioration de la qualité du lait le long de la chaîne de valorisation et l'encouragement des partenariats interprofessionnels [21].

Le Maroc en 2013 a réalisé une production laitière de 2,3 milliards de litres [22], un chiffre qui dépasse de peu l'objectif fixé par le plan laitier de 1975 (2 milliards de litres en l'an 2000). Les performances enregistrées ont été limitées par les conditions climatiques, les performances du cheptel et d'autres contraintes organisationnelles. à ces contraintes s'ajoutent les problèmes liées à la collecte, la transformation et la distribution qui ont affecté les niveaux de disponibilité qualitative du lait et des produits laitiers [19].

Actuellement, avec les accords de libre-échange et la politiques de libération du secteur, la filière laitière au Maroc se confronte à l'absence de toute protection de l'État face à la forte concurrence des produits laitiers importés. Cette concurrence est aussi fortement impactée par les coûts de productions liés aux prix des intrants agricoles qui se renchérissent d'avantage dans les marchés mondiaux [23].

II.4. Evolution de la consommation du lait

Depuis 1970 La consommation des produits laitiers a connu un rythme ascendant (+0.8% annuel) malgré une chute remarquable au début des années 1980. Cette chute est expliquée par les problèmes de sécheresse qui ont impacté les niveaux de productions. La consommation enregistrée en 1983 était même faible par rapport à celle enregistrée en 1970 avec 25 litres équivalent par personne et par an [19]. La consommation des produits laitiers au Maroc est souvent liée au pouvoir d'achat et au milieu de résidence. En fait, les zones urbaines en consomment trois fois plus que les zones rurales, avec des disparités dans les préférences en produits consommés [19].

Le niveau de consommation actuel est de 72 litres équivalent par an et par habitant, il reste toujours inférieur au 90 litres recommandé pour la ration nutritionnelle. Cet écart, montrent des

opportunités du développement de la filière laitière par l'amélioration de l'outil de production et des systèmes d'élevage.

III. Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache

III.1. Définition du lait

Selon, le 1^{er} Congrès international pour la Répression des Fraudes alimentaires et pharmaceutiques tenu à Genève le 8-12 Septembre 1908, le lait est défini comme étant « **le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum** ». Le colostrum est le liquide sécrété par la glande mammaire pendant la première semaine après la mise-bas. C'est un liquide visqueux jaunâtre riche en immunoglobulines (anticorps), en protéines solubles et en matière grasse. C'est l'aliment indispensable pour la survie du nouveau-né.

Selon le Décret n°2-00-425 du 10 ramadan 1421 (7 décembre 2000), relatif au contrôle de la production et de la commercialisation du lait et produits laitiers, le lait est le produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction. La dénomination "Lait", sans autre indication est réservée au lait de vache. Pour tout autre lait, cette dénomination doit être accompagnée de l'indication bien apparente de l'espèce animale dont il provient.

III.2. Caractéristiques organoleptiques

Un des principaux critères d'une denrée alimentaire est sa qualité organoleptique dont le goût est l'élément le plus important. La composition du lait lui confère des caractéristiques organoleptiques qui lui sont propres. C'est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotènes de la matière grasse. Avec un pH proche de la neutralité, ce liquide possède une saveur douceâtre particulière et une odeur identifiable.

Les qualités organoleptiques du lait peuvent être influencées par la composition chimique, la saison, la valeur du pH et les contaminations microbiennes ou chimiques [24]. Un autre facteur peut être ajouté, ce sont les fourrages des animaux qui peuvent fortement influencer les perceptions sensorielles du lait et de ses dérivés. En fait, les régimes à base d'herbe pâturée conduisent à des qualités sensorielles (couleur, goût et odeur) plus intenses que ceux issus d'une alimentation hivernale à base d'herbe conservée sous forme de foin et d'ensilage [25].

La couleur blanche plus au mois jaunâtre du lait est due au phénomène de diffraction de la lumière par les globules gras et les micelles de caséines. En absence de matière grasse la couleur du lait écrémé devient bleutée. En revanche le lactosérum ne contenant ni globule de matière grasse ni micelles de caséines possède une couleur jaune-verdâtre due à la présence de la riboflavine.

III.3. Propriétés physicochimiques du lait

Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion. La solution vraie est le mélange réalisé entre les glucides et les sels minéraux solubilisés dans la phase aqueuse (l'eau). La suspension colloïdale est un mélange entre les micelles de caséines, qui se présentent sous forme de particules fines dispersées n'ayant aucune affinité, et la phase aqueuse. Quant aux protéines sériques, présentant beaucoup d'affinité avec la phase aqueuse, ils se présentent sous forme de solution colloïdale. L'émulsion quant à elle, est le résultat de la dispersion des fines gouttelettes de matière grasse dans la phase aqueuse [26].

Le **Tableau 1** illustre les principales propriétés physicochimiques du lait qui sont la densité, la viscosité, le point de congélation, le point d'ébullition, la conductivité électrique, la tension superficielle, la viscosité, l'acidité, et le pH.

Tableau 1- Principales propriétés physique du lait.

Propriété physique	Minimum	Maximum	Moyenne
Densité (Kg/l)	1,027	1,033	1,030
Acidité Doronic (°D)	15	18	
pH	6,6	6,8	
Point de congélation (°C)	-0,510	-0,530	-0,520
Point d'ébullition (°C)			100,15
Conductivité électrique (ohm ⁻¹ cm ⁻¹)	0,0040	0,0055	
Tension superficielle (dyns/cm ²)	40	60	52
Viscosité (centipoise)			1,6314

III.3.1. Densité

La densité du lait (**Tableau 1**) est liée à sa richesse en matières grasses et non grasses. Etant donné que, la matière grasse possède une densité inférieure à 1 au contraire des matières sèches non grasses, la densité du lait est inversement proportionnelle à la richesse en matière grasse et proportionnelle à la richesse en matières sèches non grasses. De ce fait, La densité à elle seule ne permet pas de déceler les fraudes, car une fraude combinée, par l'écémage est l'ajout de l'eau, peut donner des valeurs normales en termes de densité [27].

La mesure de la densité est réalisée par des thermo-lactodensimètres. Cet outil, à la fois un thermomètre et un densimètre, permet de mesurer la densité et la température du lait pendant la mesure et d'effectuer les corrections en fonction de la température, pour tenir compte des conditions de mesure de densité qui doit se faire à des températures entre 15 et 20°C [27].

La densité moyenne du lait varie selon les espèces, celle du lait de vache qui est de l'ordre de 1,0316, est proche de celle du lait de chèvre (1,0320), mais elle est inférieure à celle des brebis (1,0355) [28].

III.3.2. Acidité du lait

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait possède une certaine acidité dite normale ou apparente. Cette acidité est due à la présence de protéines, des substances minérales et d'acides organiques. Le développement des bactéries lactiques conduit à la production de l'acide lactique par la fermentation du lactose. C'est cette acidité, dite développée, qui conduit à la dénaturation des protéines. L'appréciation de l'acidité du lait est réalisée par la mesure de l'acidité titrable. C'est une technique basée sur un dosage acido-basique en présence d'indicateur coloré (Phénophtaléine). Elle mesure tous les ions H⁺ présents dans le milieu et donc mesure à la fois l'acidité normale et développée du lait.

Cette analyse est réalisée à la réception du lait pour évaluer sa qualité. L'acidité du lait frais est comprise entre 15°D et 18°D (**Tableau 1**), avec 1°D correspondant à 0,1g d'acide lactique par litre de lait. Mais, il faut prendre cette analyse avec une certaine précaution, car un lait ayant une acidité titrable élevée ne veut pas dire forcément qu'il a une acidité développée élevée. Le pH constitue ainsi une analyse complémentaire pour bien s'assurer de la fraîcheur du lait.

Au contraire de l'acidité titrable, le pH mesure la concentration des ions H⁺ présents dans le milieu. Il peut ainsi mesurer l'état de fraîcheur du lait contrôlé et donc sa stabilité. L'importance de ce contrôle est liée à la propriété des protéines qui précipitent à des valeurs de pH dites isoélectriques.

Le pH du lait frais est compris entre 6,6 et 6,8 (**Tableau 1**) et peut être influencé par divers facteurs, entre-autre le stade de lactation. Les résultats montrent que le pH du lait baisse considérablement en fin de lactation, cette forte baisse est liée à l'augmentation du taux protéique pendant cette période [29].

III.3.3. Point de congélation

Le point de congélation d'un liquide constitué de l'eau et de solutés, correspond à la température à laquelle l'eau liquide et la glace sont en équilibre. Le point de congélation du lait est inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solutés abaisse le point de congélation [30].

Le point de congélation est la propriété la plus constante des caractéristiques du lait. Cette faculté est liée à l'équilibre physiologique existant entre la pression osmotique du sang et celle du lait. Le point de congélation du lait de vache se situe entre de -0.510°C et -0.530°C [31].

Malgré cette constance, le point de congélation peut subir de faibles fluctuations liées à des variations de la composition du lait. Mais la principale cause reste la dilution du lait avec de l'eau par des intentions frauduleuses ou des erreurs de manipulation (pousse à l'eau), ce qui diminue la

concentration du lactose considéré comme principale responsable de l'abaissement de point de congélations. L'acidité du lait par la fermentation lactique provoque l'abaissement de point de congélation, ainsi un 1°D abaisse le point de congélation de 0.004°C. En revanche, la pasteurisation du lait conduit à une hausse de 0.002°C du point de congélation. De manière générale les facteurs ayant des répercussions sur la composition du lait ont aussi des effets sur le point de congélation [31].

La cryoscopie à thermistance, est la méthode de référence pour la mesure du point de congélation comme définie par le standard ISO 5764 : 2002 (IDF108 : 2002) de la Fédération Internationale de Lait (F.I.L). La mesure est basée sur le principe de congélation du lait et sa cristallisation par l'agitation mécanique. La mesure est réalisée lorsque la température du lait congelé en change pas pendant 20s pour pas plus de 0,5m°C.

III.3.4. Point d'ébullition

Selon AMIOT et *al.*, (2002), le point d'ébullition est défini comme étant la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée [32]. Ainsi, comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C.

Cette propriété physique, qui diminue avec la pression, est utilisée dans les procédés de concentration du lait.

III.3.5. Conductivité électrique

La conductivité électrique, l'inverse de la résistivité électrique, mesure le contenu ionique total du lait. Pour le lait est de se situe entre 0,0040 et 0,0055 ohm⁻¹cm⁻¹ (**Tableau 1**). Elle est liée à la présence de sodium, de potassium et des ions de chlorure, et elle augmente considérablement avec la fermentation du lactose en acide lactique.

Du fait que les concentrations en sodium et en chlorure augmentent pendant les mammites, la mesure de la conductivité du lait est employée comme méthode rapide pour la détection de cette maladie [30].

Toutefois, l'utilité de cette propriété pour le cas du lait (par exemple pour détecter des fraudes avec l'eau) est considérablement réduite par l'influence de la concentration ou la dilution de la précipitation ou la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal. Les mesures de conductivité directe ne conviennent donc pas pour évaluer la quantité d'eau ajoutée au lait [33].

III.3.6. La tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force nécessaire pour augmenter la surface d'une solution et elle généralement exprimée en dyns/cm². Cette propriété est utilisée pour suivre les

changements dans les composants tensio-actifs lors de la transformation du lait, pour suivre la libération des acides gras lors de la lipolyse et comme une mesure de la tendance à la formation de mousse de lait. La tension superficielle du lait (**Tableau 1**) se situe entre 40 et 60 dyns/cm² avec une moyenne de 52 dyns/cm² [33].

Les acides gras et leurs sels et monoacylglycérols formés à la suite de la lipolyse sont tensioactifs et réduisent la tension superficielle. Cependant, la méthode n'a pas été appliquée en routine pour l'évaluation de la lipolyse parce que les acides, responsables de la saveur désignée comme rancissement hydrolytique, à chaîne courte sont solubles dans l'eau et ne portent pas atteinte à la tension superficielle [30].

III.3.7. Viscosité

Exprimée en centipoise, cette propriété se rapporte à la résistance à l'écoulement. Cette propriété est utilisée dans la conception des équipements de transformation laitière et pour évaluer l'agrégation des micelles de caséine.

La viscosité du lait est un phénomène complexe et variable selon la composition chimique du lait. C'est la richesse en protéine et matière grasse qui joue le rôle important dans cette propriété. Ceci sans oublier que le lait est un système colloïdal où les micelles entre en jeu pour produire une autre viscosité dite de structure [34].

IV. Composition du lait

Le lait est composé majoritairement de l'eau. Par ordre décroissant le lait est constitué :

- De l'eau (phase très majoritaire) ;
- De glucides, principalement le lactose ;
- De lipides constitués principalement de globules gras de triglycérides ;
- De protéines sous forme de : micelle de caséines, albumine et globuline solubles ;
- De sels minéraux ;
- Des éléments sous formes de traces : enzymes, vitamines, oligo-éléments, ...

La teneur en chaque fraction est variable selon le type de mammifère (espèce et race), le stade physiologique (stade de lactation et gestation), l'état sanitaire et la conduite du troupeau. Dans ceci on distingue des facteurs liés aux besoins spécifiques du jeune mammifère qui dépendent de sa vitesse de croissance et de son âge et des facteurs maîtrisables liés à la conduite du troupeau [35].

Le lait contient presque tous les éléments nutritifs essentiels au développement et la croissance du jeune mammifère [36]. Un kilogramme de lait de vache contient environ 866g d'eau, 50g de lactose, 36g de protéines, 41g de matière grasse et 7g de composants divers incluant minéraux, vitamines et gaz (**Figure 1**).

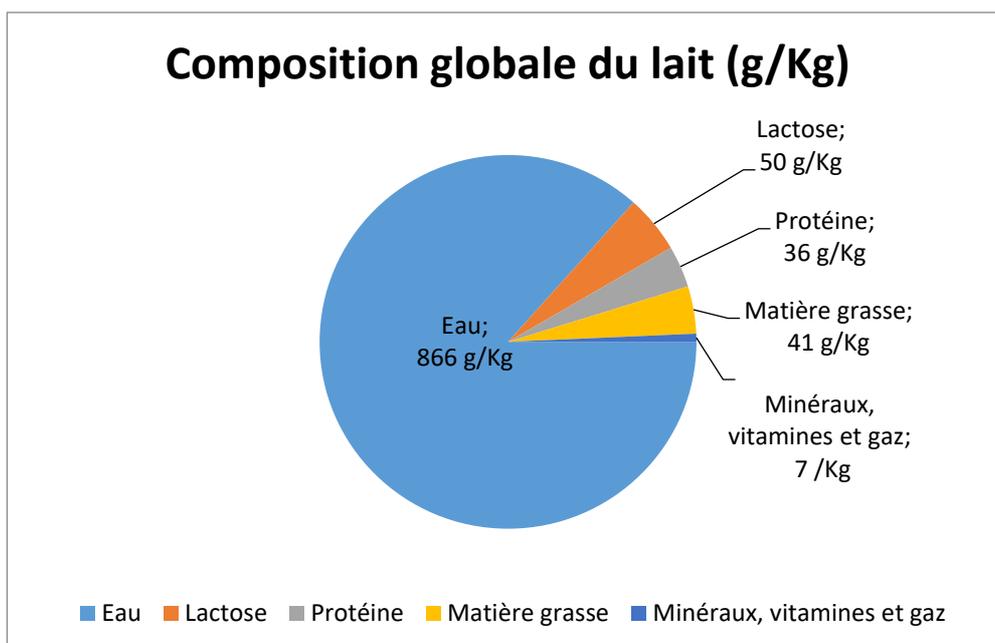


Figure 1- Composition globale du lait de vache.

Les proportions des principaux constituants de lait varient selon les espèces [37] et le **Tableau 2** montre que :

- De manière générale le lait des ruminant est riche en protéines ;
- Le lait de brebis est très riche en protéines et en lipides ;
- Le lait de vache et de chèvre possède une composition équilibrée en lipides, protéines et lactose.

Tableau 2 - Composition globale du lait de quelques espèces de mammifères en g/100g de lait.

Lait	EST*	MAT*	Protéines	Caséines	Urée	MG	Lactose	Cendres
Femme	12,6	-	1,6 – 1,2	0,5 – 0,8	-	3,75	6 – 7	0,21
Vache	13,0	3,9	3,2	2,8	0,014	3,9	4,9	0,9
Brebis	18,4	5,7	5,5	4,5	0,035	7,19	4,7	0,9
Chèvre	-	3,1	2,8	2,3	0,0385	3,38	4,4 – 4,7	0,5 – 0,8
Jument	-	-	2,0	-	-	-	-	0,4
Chamelle	12,4	-	3,0	-	-	5,38	3,3	0,7

**MAT : matière azotée totale ; EST : Extrait Sec Total.*

IV.1.Eau

L'eau constitue le composé majeur du lait, avec 902g par litre de lait. Avec son caractère polaire, l'eau forme une solution vraie avec des constituants solubles tels que les glucides et les minéraux, une solution colloïdale avec les protéines sériques hydrophiles, une émulsion avec les matières grasses hydrophobes et une suspension colloïdale avec les micelles de caséines. L'activité de l'eau dans le lait, a_w , est d'environ 0,993. Une petite quantité de l'eau du lait est liée par les protéines et par la membrane des globules gras [38].

IV.2.Matière grasse

La matière grasse du lait est constituée majoritairement de triglycérides qui représentent 98%, et se présente sous forme de globules gras (**Figure 2**) avec un diamètre de 0,2 à 15 μ m entourés d'une membrane biologique spécifique (MFGM pour « Milk fat globule membrane »). Cette richesse en triglycérides affecte les propriétés de la matière grasse du lait en termes d'hydrophobie, de densité et de fusion. Le lait contient aussi d'autres constituants lipidiques avec des proportions faibles (**Tableau 3**)

La MFGM est composée de trois couches de lipides polaires dans lesquelles sont inclus du cholestérol, des enzymes, des glycoprotéines et des vitamines [39]. La MFGM est relativement fragile face aux traitements physiques, tel que l'agitation et l'homogénéisation. Ces traitements sont capables de causer une rupture totale ou partielle de la membrane et libérer des constituants qui deviennent accessibles à l'hydrolyse et la lipolyse [26]. Cette fragilité est utilisée au niveau industriel pour la fabrication du beurre par le barattage de la crème fraîche.

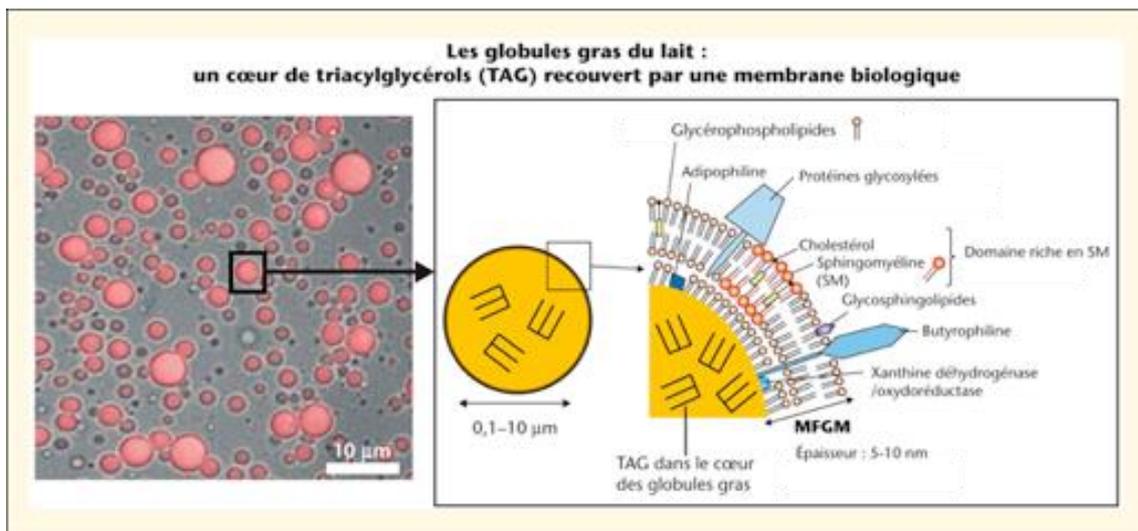


Figure 2 - Structure d'un globule de matière grasse adaptée de (Raynal-Ljutovac et al., 2011).

Les propriétés chimiques des lipides du lait peuvent avoir une influence considérable sur les caractéristiques de fusion de la matière grasse du lait, ce qui à son tour peut avoir un effet marqué sur les propriétés fonctionnelles d'un certain nombre de produits laitiers, tels que le fromage et le beurre.

L'intérêt des lipides du lait réside dans le fait qu'ils constituent une source d'acides gras essentiels, tel que l'acide linoléique que le corps ne peut pas synthétiser ; mais aussi dans les qualités organoleptiques et rhéologique que confère la matière grasse du lait aux produits qui la contiennent.

Le taux de matière grasse est l'une des composantes principales du lait qui rentre dans l'estimation de la valeur marchande du produit. D'ailleurs, c'était le premier paramètre sur lequel se basait le paiement du lait pendant longtemps. Pour déterminer le taux de matière grasse dans le lait, la méthode officielle utilisée est la méthode acido-butyrique dite de Gerber décrite par la norme ISO 488 : 2008 (IDF 105 : 2008).

Tableau 3 - Constituants lipidiques de la matière grasse du lait de vache et leur localisation (g/100g de matière grasse) [40].

Constituants lipidiques	Proportions	Localisation
Triglycérides	96-98	Globule gras
Diglycérides	0,3-1,6	Globule gras
Monoglycérides	0,0-0,1	Globule gras
Phospholipides	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
Cérébrosides	0,0-0,08	Membrane du globule gras
Stérols	0,2-0,4	Globule gras Membrane du globule gras et lactosérum
Acides gras libres	0,1 -0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
Esters du cholestérol	Traces	Membrane du globule gras
Vitamines	0,1-0,2	Globule gras

IV.2.1. Les triglycérides

Les triglycérides sont les glycérides majoritaires du lait, ce sont des esters de glycérol, ils résultent de fixation de trois acides gras sur le glycérol (**Figure 3**).

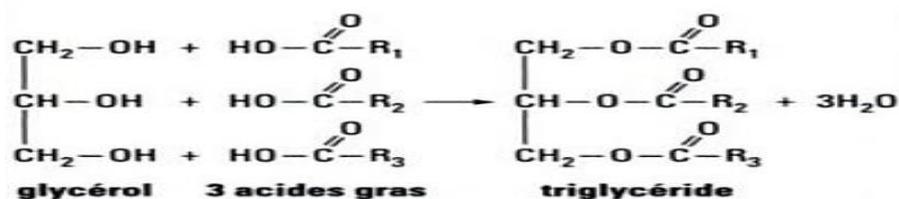


Figure 3 - Formation d'un triglycéride.

L'origine des lipides et donc des acides gras est double, ils proviennent en grande partie du plasma sanguin et dans une moindre ils sont issus de la synthèse *novo* dans les glandes mammaires. Les deux sources aboutissent à des acides gras très différents. Les acides gras synthétisés de *novo* sont de courte chaîne ou de longueur moyenne (C4 à C14 et quelques C16). En revanche, les acides gras provenant des lipides plasmatiques sont en C18 et C16 [41]. La composition du lait en acide gras est donnée par le **Tableau 4**.

Rien que pour les combinaisons possibles d'acides gras, la matière grasse du lait est considérée comme l'une des graisses les plus complexes [26]. Par exemple, si seuls les 14 acides qui sont présents à des concentrations supérieures à 1% sont pris en compte et si la position sur la molécule de triacylglycérol est ignorée, les combinaisons possibles de triacylglycérols avec composition différente sont évaluées à 560 possibilités, issues de la dérivée de l'équation ci-dessous :

$$N = \frac{n(n+1)(n+2)}{6}$$

- **N** est le nombre de triacylglycérols.
- **n** est le nombre d'acides gras.

Ces triglycérides peuvent être simples avec trois acides gras identiques ou mixtes avec un ou trois acides gras différents. En raison de cette complexité, la détermination des triacylglycérols individuels est une tâche très difficile [42].

L'étude de 223 triacylglycérols a permis de se rendre compte que la disposition des acides gras sur le glycérol n'est pas aléatoire. Généralement, les triacylglycérols ont la configuration suivante [43] :

$$(sn1 ; sn2 ; sn3) = (C4:0 \text{ ou } C6:0 ; C12 \text{ à } C18 ; C12 \text{ à } C18)$$

IV.2.2. Les phospholipides

Les phospholipides qui représentent 0,8% de la matière grasse jouent un rôle important avec leur propriété amphiphile, avec 65% de ces constituants qui se situent au niveau des MFGM et le reste se trouve soluble dans la phase aqueuse du lait. 90% des phospholipides sont représentés par les phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines et les sphingomyélines.

IV.2.3. La fraction insaponifiable

A côté des triglycérides et des phospholipides, le lait contient des substances dites insaponifiables. Dans cette fraction on trouve principalement les stérols, les caroténoïdes, les xanthophylles et les vitamines liposolubles (A, D, K et E). Les stérols représentent un composant mineur

de la matière grasse avec 0,3%, dont le cholestérol représente 95%. Dans les caroténoïdes du lait la β -carotène est la plus importante. Elle est aussi un précurseur de la vitamine A.

Tableau 4 - Distribution des principaux acides gras du lait en %.

Acide gras	Nomenclature	Moyenne
Saturés		
Butyrique	C4:0	3,6
Caproïque	C6:0	2,3
Caprylique	C8:0	1,3
Caprique	C10:0	2,7
Laurique	C12:0	3,3
Myristique	C14:0	10,7
Pentadecanoïque	C15:0	1,2
Palmitique	C16:0	27,6
Stéarique	C18:0	10,1
Arachidique	C20:0	0,2
Mono insaturés		
Myristoléique	C14:1	1,4
Palmitoléique	C16:1	2,6
Oléique	C18:1	26
Polyinsaturés		
Non conjugués		
Linoléique	C18:2	2,5
Linoléique	C18:3	1,4
Arachidonique	C20:4	0,3
Conjugués		
Diène	C18:2	0,8
Polyènes	C18,20,22:3 et 4	Traces

IV.3. Protéines

Le lait contient une multitude de protéines différentes, généralement classées en trois fractions de la matière azotée totale : caséines (α_{S1-} , α_{S2-} , β - et κ -caséines), qui sont les plus abondantes (78%) ; protéines de lactosérum (17%), qui comprennent α -lactalbumine (α -La), β -lactoglobuline (β -Lg), sérum albumine bovine (SAB), et immunoglobulines (Ig); et la fraction d'azote non protéique (5%). Les protéines du lait comprennent également les protéines membranaires des globules gras et une grande variété d'enzymes et d'hormones. A toute cette variété s'ajoute des protéines issues de la protéolyse par la plasmine. Ainsi, la γ -caséine et les protéoses peptones (PPs) doivent leur existence à la protéolyse de la β -caséine (**Tableau 5**).

La distinction entre ces trois fractions est déterminée par leurs méthodes d'analyse. La caséine correspond à la fraction d'azote insoluble par acidification à un pH d'environ 4,6 (pH isoélectrique), l'azote non-protéique correspond à la fraction d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12%. Les protéines du lactosérum correspondent à la différence entre la fraction d'azote non-caséique et d'azote non-protéique. Ces définitions permettent aussi de distinguer entre la teneur en azote total et la teneur en protéine vraie, cette dernière est la différence entre la matière azotée totale et la fraction d'azote non protéique [44].

Traditionnellement, le lait a été payé principalement sur la base de sa teneur en matières grasses. Maintenant, à côté de la matière grasse, le taux protéique fait partie des paramètres de paiement du lait [33].

IV.3.1. Caséines

Les caséines, principales protéines du lait, représentent 80% des protéines. Il s'agit de α_{S1-} , α_{S2-} , β - et κ -caséines, sont tous synthétisés par l'épithélium mammaire sécrétoire [45]. Environ 80 à 95% de la caséine dans le lait normal se présente sous la forme de particules en dispersion colloïdale, appelés micelles (**Figure 4**), qui contiennent sur une base sèche 94% de protéines et 6% de phosphate de calcium colloïdal (PCC), qui comprend du calcium, du magnésium, du phosphate et du citrate. La forme des micelles de caséine est sphérique, dont la taille varie de 50 à 500 nm de diamètre avec une moyenne d'environ 120 nm [33].

Les α_S - et β -caséines sont des phosphoprotéines qui précipitent avec les ions Ca^{2+} , mais la κ -caséine les protège contre les précipitations. Cependant, la κ -caséine est facilement attaquée par la présure (chymosine). C'est une enzyme capable de cliver une partie de la molécule de la κ -caséine ; et elle perd, ainsi, sa capacité de protection. En conséquence, la caséine précipite en présence d'ions calcium. Ces réactions sont la base de la coagulation du lait par la présure et la fabrication du fromage [46]

Tableau 5 - Concentration moyenne du lait en protéine [46].

Protéine	Lait g/kg	Lait g/100
Caséines	26	78,3
α_{S1} -caséine	10,7	32
α_{S2} -caséine	2,8	8,4
β -caséine	8,6	26
κ -caséine	3,1	9,3
γ -caséine	0,8	2,4
Protéines sériques	6,3	19
β -lactoglobuline	3,2	9,8
α -lactalbumine	1,2	3,7
Sérum albumine bovine	0,4	1,2
Protéose peptone	0,8	2,4
immunoglobulines	0,8	2,4
IgG1, IgG2	0,65	1,8
IgA	0,14	0,4
IgM	0,05	0,2
Divers	0,9	2,7
Lactoferrine	0,1	—
Transferrine	0,01	—
Les protéines membranaires	0,7	2
Les enzymes	—	—

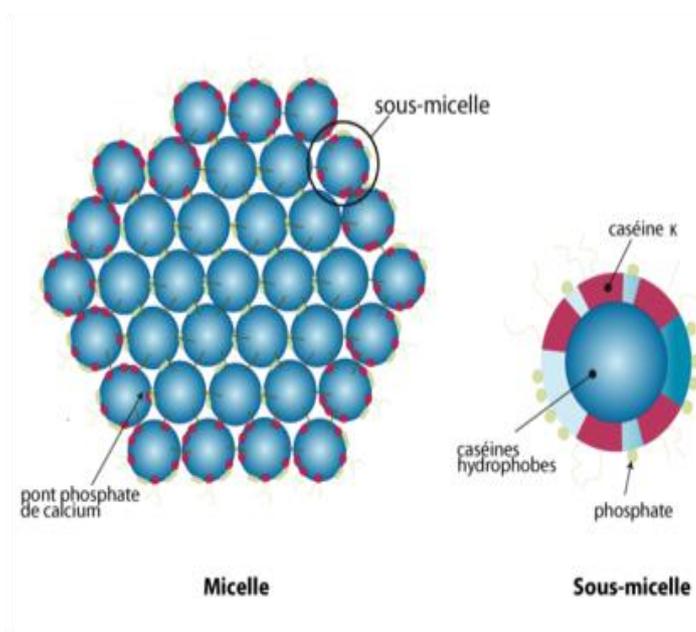


Figure 4 - Schéma de la micelle et la sous-micelle de caséine.

IV.3.2. Protéines du lactosérum

Environ 20% des protéines de lait de vache sont de protéines de lactosérum (sérum). Et comme pour le cas des caséines, les principales protéines de lactosérum sont également synthétisées et sont spécifiques à la glande mammaire, mais plusieurs protéines mineures dans le lait sont prélevés directement du sang [47]. Les protéines majeures du lactosérum sont la β -lactoglobuline et la α -lactalbumine. On y trouve aussi, mais avec des concentrations beaucoup plus faibles, les immunoglobulines, l'albumine de sérum bovin, la lactoferrine et la lactoperoxydase [48].

IV.3.3. Azote non-protéique (ANP)

Le lait contient aussi des composés azotés non protéiques tels que l'urée, l'acide urique, la créatine, la créatinine et autres composants (**Tableau 6**). L'urée qui représente le constituant majeur de l'ANP (environ 50% d'ANP), joue un rôle important dans la stabilité thermique du lait. Ce qui explique certaine variation saisonnière de la stabilité thermique du lait, et ce par les variations de la teneur du lait en urée entre les périodes de pâturage frais et les périodes de l'alimentation sèche [49].

Tableau 6 - Azote non-protéique du lait de vache [47].

Composant	Azote (mg/L)
Ammoniac	6.8
Urée	83.9
créatinine	4.1
Créatine	39.4
Acide urique	22.9
l'azote α -amino	37.5
non comptabilisée	88.2

IV.4. Lactose

Le lactose est le principal glucide dans le lait des mammifères, il est généralement admis que les sources non-mammifères de lactose sont très rares. Un litre de lait de vache contient environ 50g de lactose. Le lait peut contenir d'autre sucre mais sous forme de traces. On peut citer les polysides contenant du fructose et des glucides azotés tels que le N-acétylglucosamine [50].

La teneur du lait en lactose varie selon l'alimentation des vaches, des facteurs individuels, l'état de santé et spécialement selon le stade de lactation. La teneur en lactose diminue significativement durant le stade de lactation au contraire des concentrations en lipides et des protéines qui diminue au début de la lactation et augmentent significativement au cours de la seconde moitié de la lactation.

Les mammites augmentent le niveau de NaCl dans le lait et diminuent celui du lactose. Ceci est lié au fait que le lactose, le sodium, le potassium et les chlorure jouent un rôle important dans le maintien de la pression osmotique du lait au cours de la sécrétion du lait. En effet, il y'a une relation inverse entre la teneur en lactose et celle des cendres dans le lait [33].

Le lactose est un sucre réducteur formé par l'union entre une molécule de α ou β -glucose et une molécule de β -galactose (**Figure 5**). Le pouvoir sucrant du lactose est faible par rapport au saccharose, le glucose ou le fructose. Par exemple, 1,08%, 2,2% et 4,91% de saccharose sont équivalentes en douceur, respectivement, à 3,75%, 7,5% et 15,0% des solutions de lactose en équilibre [51].

Ce caractère réducteur lui permet de participer dans la réaction de Maillard ou brunissement non-enzymatique pour produire une glucosamine (lactosamine). Les conséquences de cette réaction sont désirées dans certains produits tels que le café, frites de pommes de terre, croûte du pain. Mais

pour le cas du lait les conséquences sont indésirables pour la couleur, la saveur et la valeur nutritive du lait.

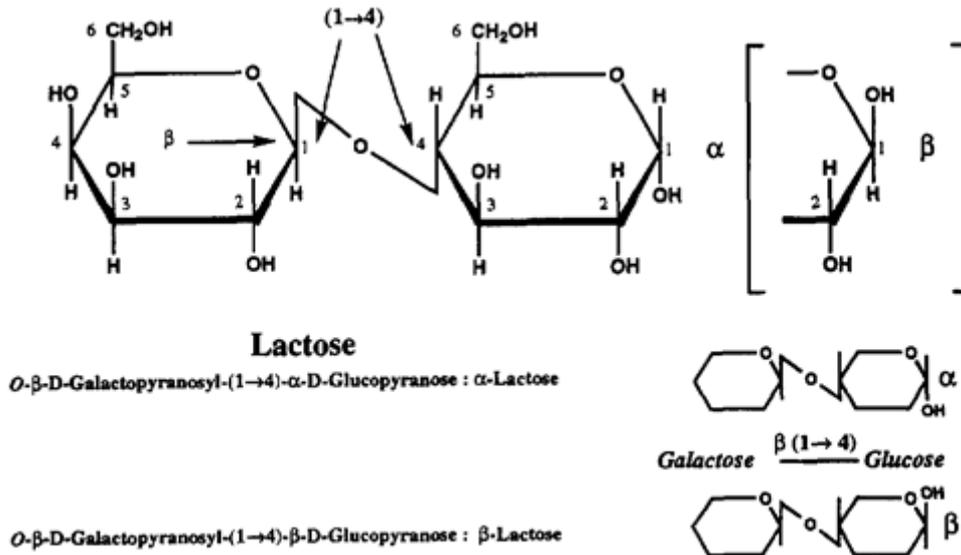


Figure 5 - Structure moléculaire du lactose.

Le lactose est facilement dégradé par les bactéries lactiques en acide lactique, ou en éthanol par certaines levures. Le lactose constitue ainsi un substrat pour les bactéries lactiques lors des fermentations des produits laitiers (lait fermenté, yaourt et fromage) et confère au lait le caractère de produits facilement périssable.

La plupart des humains adultes sont incapables d'ingérer le lactose en raison d'une insuffisance de la galactosidase intestinale. Cela pousse beaucoup de consommateur à exclure les aliments contenant du lactose de leur alimentation. Cependant, le lactose peut être retiré du lait et des produits laitiers par la technologie de membrane ou par pré-hydrolyse par β-galactosidase exogène au lait [52].

IV.5. Minéraux et Oligoéléments

Le lait contient environ 7,3 g/litre de matières salines ou minéraux. Les plus importants sont le potassium, le calcium, le phosphore et le chlore (**Tableau 7**). Le sodium, le potassium et le chlore sont presque complètement (95-96%) présents dans la vraie solution et sous forme ionique et, par conséquent diffusent librement à travers la membrane au cours de l'ultrafiltration et l'électrodialyse de lait. Le calcium et le magnésium, le phosphate et le citrate sont en partie en solution et en partie en suspension colloïdale et cela en fonction du pH du lait. Environ 20 à 30% du calcium et du magnésium existent sous forme d'ions libres et le reste sous forme des sels de citrate et de phosphate. Lorsque le

pH du lait diminue dans la fabrication de yaourts et laits fermentés, la forme colloïdale se transforme progressivement en forme ionique. A un pH de 4,4 la plupart des minéraux sont sous forme ionique, solubles et diffusibles [53].

Tableau 7 - Constituants majeurs des matières salines du lait (g/L).

Constituants	Teneurs moyenne
Potassium	1,50
Sodium	0,50
Calcium	1,25
Magnésium	0,12
Phosphore	0,95
Chlore	1,00
Soufre	0,35
Acide citrique	1,80

Du point de vue nutritionnel le lait constitue une excellente source de calcium et de phosphore et aussi d'autre élément ayant un grand intérêt nutritionnel, c'est le cas des oligoéléments comme le fer et le cuivre (**Tableau 8**). Ces métaux se présentent largement sous des formes complexes avec les protéines, comme pour le cas du fer et de cuivre qui se trouvent, à l'état natif, liés à la membrane protéique des globules gras et en cas de contamination se trouvent liés aux protéines du lactosérum [50].

Tableau 8 - Principaux oligoéléments du lait.

Constituant	Variations usuelles en µg/l
Aluminium	500-600
Brome	300-2000
Cuivre	20-50
Fer	100-300
Fluor	100-200
Iode	20-100
Manganèse	20-30
Molybdène	30-60
Silicium	1500-10000
Strontium	70-400
Zinc	3000-4000

IV.6. Vitamines

Les vitamines sont souvent classées en deux groupes selon leur solubilité dans l'eau ou dans la matière grasse, on trouve les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B et C). L'intérêt de cette fraction est lié à son rôle dans la croissance, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme. Même avec des taux assez faibles, le lait peut constituer une source de vitamines variées (**Tableau 9**).

Le lait est une source importante des vitamines B. Elles sont stables à diverses conditions de chauffage et de traitement du lait. Cependant, la vitamine B2 est sensible à la lumière et en cas d'exposition au soleil le lait développe un défaut de saveur. La teneur du lait en vitamine C est très faible et elle est inactivée par traitement thermique.

L'activité naturelle de la vitamine A dans le lait est dû au rétinol et au pigment β -carotène. Leur niveau ainsi que celui de la vitamine D et E varie dans le lait en fonction de la saison et de l'alimentation. La vitamine D est importante pour la santé des os et la vitamine E est un antioxydant. Cependant, la vitamine K est présente dans le lait, mais son rôle nutritionnel diététique est mineur. Les vitamines liposolubles se trouvent dissoutes dans la matière grasse du lait et se trouvent ainsi en abondance dans le beurre et la crème [53].

Tableau 9 - Concentrations en vitamines du lait de vache [40].

Vitamines	Moyennes en mg/l
Vitamines hydrosolubles	
B1 (Thiamine)	0,42
B2 (Riboflavine)	1,72
B6 (Pyridoxine)	0,48
B12 (Cobalamine)	0,0045
Acide nicotinique	0,92
Acide folique	0,053
Acide pantothénique	3,6
Inositol	160
Biotine	0,036
Choline	170
C (Acide ascorbique)	8
Vitamines liposoluble	
A	0,37
B-Carotène	0,21
D (Cholecalciferol)	0,00088
E (Tocophérol)	1,1
K	0,03

IV.7. Enzymes

Naturellement le lait cru contient des faibles teneurs en enzymes (phosphatase alcaline, la plasmine et la lipase), et elles ont toutes un intérêt industriel.

La phosphatase alcaline est une enzyme thermolabile, son absence dans le lait après la pasteurisation, constitue un indicateur de l'efficacité de ce traitement thermique. Quant à la plasmine, stable à la température de pasteurisation, peut hydrolyser les β - et α_{s1} -caséine dans le lait et pendant

la maturation des fromages. Le lait contient aussi des lipases avec divers pH optimums. Ces enzymes sont liées au métabolisme de la matière grasse et à la détérioration de la qualité des produits laitiers. Le lysozyme et la lactoperoxydase sont caractérisés par leur activité bactéricides contre les bactéries gram-positives [53]. On peut les considérer comme les premières défenses du lait contre le développement de bactéries après la traite.

IV.8. Variation de la composition du lait

La composition du lait varie en fonction de divers facteurs qui sont liés à l'animal producteur, au milieu et à la conduite alimentaire et sanitaire des troupeaux. Ces facteurs affectent la quantité et la qualité du lait produit. Face à certains facteurs comme le stade physiologique et la saison, l'éleveur n'a aucun moyen de maîtrise. Mais, il se trouve dans l'obligation de savoir l'effet de ces facteurs sur la qualité et la quantité du lait produit.

Le **Tableau 2** montre les variations existantes entre quelques espèces. Les résultats mentionnés sont des résultats des laits de mélange. Mais en étudiant les laits individuels d'autres facteurs s'ajoutent. Outre les changements que le lait subit au stade de l'animal, d'autres changements peuvent avoir lieu aux cours du traitement du lait.

IV.8.1. Variation au stade de l'animal

Race : les variations de la qualité du lait entre les espèces productrices sont liées en grande partie aux besoins du nouveau-né. Par ailleurs, des effets liés à la race peuvent aussi influencer la qualité du lait produit [50].

Individu : Dans la même race, les laits produits n'ont pas la même composition, même pour des conditions de productions identiques. Les aptitudes des vaches à produire des laits riches en matière protéique ou en matière grasse sont de nature génétiques et elles sont héréditaires [50].

Stade physiologique : L'effet du stade physiologique de la vache est marqué par une richesse qui évolue inversement à la quantité produite. Ce phénomène est lié en partie à l'avancement du stade de lactation, qui diminue la persistance de la production laitière. La teneur en matière grasse et en protéines est maximale pendant les premiers jours de lactation, minimales au cours du 2^{ème} et le 3^{ème} mois de lactation, et après évolue progressivement jusqu'à la fin de la lactation. La proportion des caséines dans les protéines reste pendant toute la lactation quasi-constante à hauteur de 80 %. Cependant, la composition de la matière grasse du lait varie au cours du stade de lactation, cette variation est caractérisée par une augmentation de la teneur en acides gras à chaînes courtes au détriment de ceux à chaînes longues [29].

Saison : Les variations observées dans la qualité du lait au cours de la saison sont en étroite relation avec l'alimentation et le stade physiologique. L'effet propre de la saison a pu être mis en

évidence avec l'aide des méthodes statistiques. La production laitière est maximale au mois de juin et minimale en décembre. A l'inverse, les taux de matières grasses et de protéines sont les plus faibles en été et plus élevés en hiver. Cette variation est principalement liée à la durée du jour, avec un double effet : les longues journées permettent à la vache d'ingérer plus d'aliments et de produire plus de lait mais la longue durée d'exposition de l'animal a un effet négatif sur l'équilibre hormonal de la vache aboutissant à un lait moins riche [29].

Alimentation : Constitue un facteur important que l'éleveur doit gérer de façon optimale. Avec une alimentation rationnelle, ni suralimentation ni insuffisance alimentaire, le rendement laitier est régulé sans perturbation de la santé et de l'équilibre digestif de la vache laitière.

L'effet de l'alimentation impacte fortement la composition de la matière grasse du lait. Ainsi, on peut agir sur la fermeté du beurre en servant une alimentation à base de fourrage vert pour produire un beurre mou. Ou au contraire, on peut produire un beurre plus ferme en servant une alimentation à base de betteraves et de tourteaux. Ceci est dû à l'effet de l'alimentation sur la production d'acides gras ayant un point de fusion faible ou élevé [50].

Nombre de traite : Au cours de la traite de la vache, le premier lait produit est pauvre en matière grasse mais augmente jusqu'à la fin de la traite. Il faut donc veiller à la vidange totale de la mamelle pour ne pas provoquer un écrémage du lait.

Certes, le nombre de traite conduit à un accroissement de la quantité de lait produit et la teneur en matière grasse. Mais pour des raisons purement économiques les éleveurs pratiquent seulement deux à trois traites par jour. En cas de deux traites par jour, ce qui est généralement pratiquée, le lait de la traite du matin est plus abondant et moins riche en matière grasse par rapport au lait de la traite du soir [50].

IV.8.2. Variation au cours du traitement du lait

Pour inhiber des changements au niveau de la composition du lait on applique généralement un refroidissement du lait à 4°C. Dans certain élevage, le refroidissement du lait est réalisé directement après la traite. Le respect de la chaîne du froid pendant le transport et le stockage est primordial pour préserver la qualité de ce produit fragile.

Au cours du traitement du lait, la composition et les propriétés du lait changent. Ces changements peuvent être recherchés par le procédé appliqué ou encore le résultat d'un effet indésirable qu'on ne peut pas éviter.

Traitements thermiques : Les traitements thermiques sont pratiquement appliqués, pour tuer les bactéries néfastes qui causent beaucoup de changements chimiques et autres dégâts et dont la prolifération dépend de la température et du temps de traitement. La pasteurisation basse température peut éliminer les bactéries pathogènes et inhibe l'activité de certaines enzymes sans, pour autant, avoir

des effets considérables sur la composition du lait. Au contraire, la pasteurisation haute température permet l'élimination de toutes formes végétatives, l'inactivation de la plupart des enzymes et agit même sur la solubilité de certaines protéines du lactosérum qui deviennent ainsi insoluble dans la phase aqueuse.

La stérilisation est censée tuer tous les microorganismes et les spores. Ce traitement sévère provoque beaucoup de changements de la composition du lait comme le brunissement non-enzymatique, l'inactivation de toutes les enzymes et la production de l'acide formique. Quant au traitement UHT, il est considéré comme une stérilisation avec minimisation des effets sur la composition chimique du lait. Pour ce traitement, certaines enzymes restent actives.

Séparation : La séparation du lait est basée sur la différence entre masse volumique de la crème et celle du lait écrémé. Cette séparation est réalisée par le passage du dans un séparateur dit écrémeuse. A la sortie du séparateur le lait devient écrémé et contient 0,05 à 0,08% de matières grasses. L'intérêt de cette opération unitaire est lié aux opérations de standardisation du lait en fonction du produit à fabriquer. L'écrémage du lait s'accompagne d'une élimination de boues qui contiennent plus de 60% de matière sèche avec plus de 80% de matières azotées [54].

Homogénéisation : L'homogénéisation du lait a pour but de réduire la taille des globules gras. Elle inhibe la remontée de la matière grasse qui se trouve ainsi dispersée dans le lait. En fait, l'homogénéisation entraîne l'adsorption des caséines et des protéines de lactosérum à la membrane des globules gras, ce qui conduit à la formation de petites particules micellaires, difficilement sédimentables par centrifugation [55]. On distingue deux types d'homogénéisation une partielle et l'autre totale. Cette dernière est appliquée pour les produits de longue conservation (produits stérilisés). Quant à l'homogénéisation partielle, elle est généralement appliquée pour les produits de courte durée de conservation (produits pasteurisés). L'homogénéisation occasionne aussi la dénaturation des protéines de lactosérum, ralentissait les réactions enzymatiques, et en augmentant la surface de la matière grasse dans le lait, celle-ci devient plus accessible aux lipases [56].

Evaporation : C'est l'élimination de l'eau pour produire un lait concentré. Elle est généralement appliquée à basse pression pour limiter les dégâts liés aux traitements thermiques. Cette concentration cause divers changements dans le lait, causés principalement par la réduction de l'activité de l'eau, la diminution du pH et les changements de l'équilibre salin [46]. Le préchauffage généralement appliqué avec ces procédés conduit à la dénaturation des protéines du lactosérum et leur association avec les caséines. Pendant l'évaporation la taille des micelles des caséines augmente à cause de l'agrégation des micelles de caséines et de l'association des protéines du lactosérum avec les caséines [57].

IV.9.Composition microbiologique du lait

Le lait constitue un aliment complet pour le nouveau-né, et constitue aussi un excellent milieu de croissance pour divers microorganismes. Avec son pH proche de la neutralité et sa richesse en eau et en constituant biochimiques, le lait peut être considéré comme un véritable milieu de culture. Presque tous les microorganismes y trouvent les éléments nécessaires pour leur croissance et développement.

En l'absence de mammites, le lait est sécrété exempt de microorganismes, les contaminations se produisent ultérieurement par différentes sources. Les sources de contaminations sont principalement liées à l'hygiène du pis de la vache, des équipements de traite et des ustensiles utilisés. La qualité microbiologique du lait dépend de la maîtrise des sources de contaminations depuis le producteur jusqu'au consommateur.

Les sources de contaminations les plus communes sont associées aux équipements laitiers (machine de traite, conduites, tank de stockage et citerne de transport). Un mauvais nettoyage laisse des résidus laitiers dans ces équipements ce qui permet un excellent environnement pour la croissance des bactéries. Les bactéries qui se développent dans ces résidus contaminent par la suite les laits qui en entrent en contact.

Les micro-organismes présents dans le lait peuvent être divisés en trois groupes : les microorganismes pathogènes et producteurs de toxines, les microorganismes d'altération (saprophytes) et les microorganismes utilisés pour la production des produits fermentés et donc ayant un intérêt à l'échelle industrielle. Mais, il faut noter que certains microorganismes peuvent à la fois appartenir à deux de ces groupes cités, c'est le cas des bactéries lactiques qui peuvent causer des dégradations et être utilisées pour la fermentation du lait.

Les microorganismes pathogènes : Les micro-organismes pathogènes sont responsables d'intoxication ou d'infection. La croissance de ces bactéries est inhibée par le refroidissement du lait et par le phénomène de compétition entre microorganismes. Cette compétition est très marquante en cas de présence de bactéries lactique, qui en plus de l'acide lactique produisent des agents inhibiteurs pour ce genre de microorganismes.

Les risques associés à la présence de ce genre de microorganismes dans le lait, dépendent de la charge initiale lors de contamination du lait. La plupart d'entre eux se développent lentement (*Mycobacterium*, *Brucella*, ...) et d'autre ne peuvent pas se développer dans le lait (virus).

Les microorganismes d'altération : L'altération du lait et des produits laitiers se manifeste par des odeurs et des saveurs désagréables et des changements au niveau de la texture. Les principaux micro-organismes d'altération du lait et des produits laitiers sont les bacilles gram-négatives (*Pseudomonas* et coliformes), les bactéries sporulées gram-positives (*Bacillus* et *Clostridium*), les bactéries lactiques, les levures et les moisissures.

Les microorganismes de la fermentation : Pour l'élaboration de produits laitiers fermentés, fromages et yaourts, on utilise des sélections de bactéries lactiques et d'autres microorganismes. La

sélection est basée sur les caractéristiques recherchées dans les produits à fabriquer, comme l'arôme, la vitesse d'acidification et aussi d'autre critère technologique comme la résistance aux bactériophages et à la chaleur. Les principaux microorganismes de ce groupe sont les bactéries lactiques qui jouent un rôle essentiel dans les industries laitières. Elles peuvent être utilisées seules ou en association avec d'autres microorganismes surtout en fromagerie. On y distingue des bactéries lactiques homofermentaires qui ne produisent que l'acide lactique lors de la dégradation du lactose, et les hétérofermentaires qui produisent en plus, d'autres constituants tel que des substances aromatisantes.

Chapitre 2 : la spectroscopie infrarouge et chimiométrie.

I. Introduction

La spectroscopie infrarouge (IR) est l'une des techniques spectroscopiques la plus utilisée pour la l'identification et la quantification des composés. Elle est basée sur l'absorption du rayonnement infrarouge par les matériaux. Le but principal de l'analyse spectroscopique IR est de déterminer les groupes fonctionnels chimiques que contient un échantillon. De manière générale, les méthodes spectroscopiques sont basées sur des aspects physiques pour caractériser la matière [58]. Différents groupes fonctionnels absorbent des fréquences caractéristiques du rayonnement IR. Ainsi, la spectroscopie IR est un outil important et populaire pour l'élucidation structurale et l'identification des composés.

Le développement technologique a permis l'exploitation des spectres infrarouge et l'évolution technologiques des détecteurs IR a permis une meilleure détection du rayonnement et un raccourcissement des délais de réponse. Les progrès de la spectroscopie infrarouge ont toujours été liés au développement des instruments de mesure [59]. Ce développement a permis de mieux détecter ce rayonnement et d'obtenir une réponse d'une manière de plus en plus rapide.

La spectroscopie infrarouge renseigne sur les groupements fonctionnels, mais elle peut être avantageusement combinée aux méthodes chimiométriques pour extraire de l'information cachée dans les spectres infrarouges. La nomination « chimiométrie » est d'origine anglais « *chemometrics* », nouvelle discipline reliant au départ, analyse de données dans la chimie analytique. Les objectifs de cette discipline sont multiples, ils s'incluent La description et l'exploration des données, la classification, la modélisation et l'optimisation des conditions expérimentales. Actuellement, il recouvre l'application des méthodes statistiques et informatique à l'ensemble des données, soit de la chimie, de la physique, des sciences de la vie et de l'économie.

II. La Spectroscopie Infrarouge

II.1. Historique

L'histoire de la spectroscopie IR a commencée avec l'expérience de *Herschel* avec un thermomètre ça fait 200 ans. Avant cette expérience l'IR était inconnu, *W. Herschel* l'a découvert le 11 février 1800 à la suite de ces expériences sur la diffraction de la lumière du soleil par un prisme et les mesures effectuées sur la température de chaque couleur. Ensuite, Il a construit un monochromateur utilisant un thermomètre comme un détecteur afin de mesurer la distribution de l'énergie dans la lumière du soleil. Il a constaté que la température la plus élevée était juste au-dessous du rouge, ce que nous appelons maintenant l'infrarouge. Par la suite la caractérisation du rayonnement infrarouge et la mise

au point d'instruments de détection de ce rayonnement est le résultat de l'apport considérable des travaux de *H. Rubens*, professeur à l'université de Berlin. Les études des interactions de la matière avec les ondes électromagnétiques étaient parallèles avec le développement relatif à la lumière. Ceci a permis de tracer le début de la spectroscopie [60].

Ces études se basent sur l'émission et l'absorption atomique que Balmer a renforcée en 1885 par la caractérisation du spectre de l'atome d'hydrogène où quatre raies lumineuses ont été observées. En 1913, le physicien *Niels Bohr* a été le premier à formuler une théorie décrivant les spectres de raies observées dans la lumière émise d'une lampe à décharge de l'hydrogène. Il s'est basé sur ces observations pour suggérer que les atomes perdent ou gagnent de l'énergie sous la forme de « quanta ». Les théories relatives à la lumière ont connu une très forte évolution dans les années 1900, avec le concept du corps noir élaboré par *Planck*. Il a supposé qu'un oscillateur de fréquence naturelle ν ne pouvait donner ou recevoir de l'énergie que par paquet d'amplitude E . Hypothèse de quantification de l'énergie, confortée par l'étude de l'effet photoélectrique (l'énergie cinétique d'électrons émis) à partir d'une surface métallique soumise à une lumière visible ou ultra-violette, est proportionnelle à la fréquence de la lumière et non à son intensité. *Albert Einstein* a expliqué ce phénomène en 1905, en proposant que l'énergie d'un faisceau lumineux est liée à sa fréquence (Équation 1).

$$\text{Équation 1 : } E = h \cdot \nu$$

Avec h est la constante de Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34}$ J.s) et ν est la fréquence de la lumière.

Bien qu'un certain nombre d'expériences sur le proche infrarouge aient été effectuées au début des années 1920, ce n'est qu'au milieu des années 1960 que la spectroscopie proche infrarouge (PIR) ou Near infrared (NIR) ait été pratiquement utilisée. C'est *Karl Norris* du ministère de l'Agriculture des États-Unis qui a reconnu le potentiel de cette technique analytique et a introduit la spectroscopie proche infrarouge dans la pratique industrielle [61]. Et depuis les années 1970, la spectroscopie dans le domaine infrarouge a pris de plus en plus d'importance.

II.2. Bases de la spectroscopie infrarouge

II.2.1. Natures et propriétés des radiations infrarouges

Le spectre électromagnétique est généralement divisé en plusieurs régions : les rayons gamma, les rayons X, l'ultraviolet, le visible, l'infrarouge, les microondes et les ondes radio fréquences (**Figure 6**). Le domaine infrarouge s'étend de 0.8 μm à 1000 μm . Il est divisé en trois zones selon la fréquence: Le proche infrarouge (PIR) (0,8 à 2,5 μm soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (MIR) (2,5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (LIR) (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1}) (**Figure 7**).

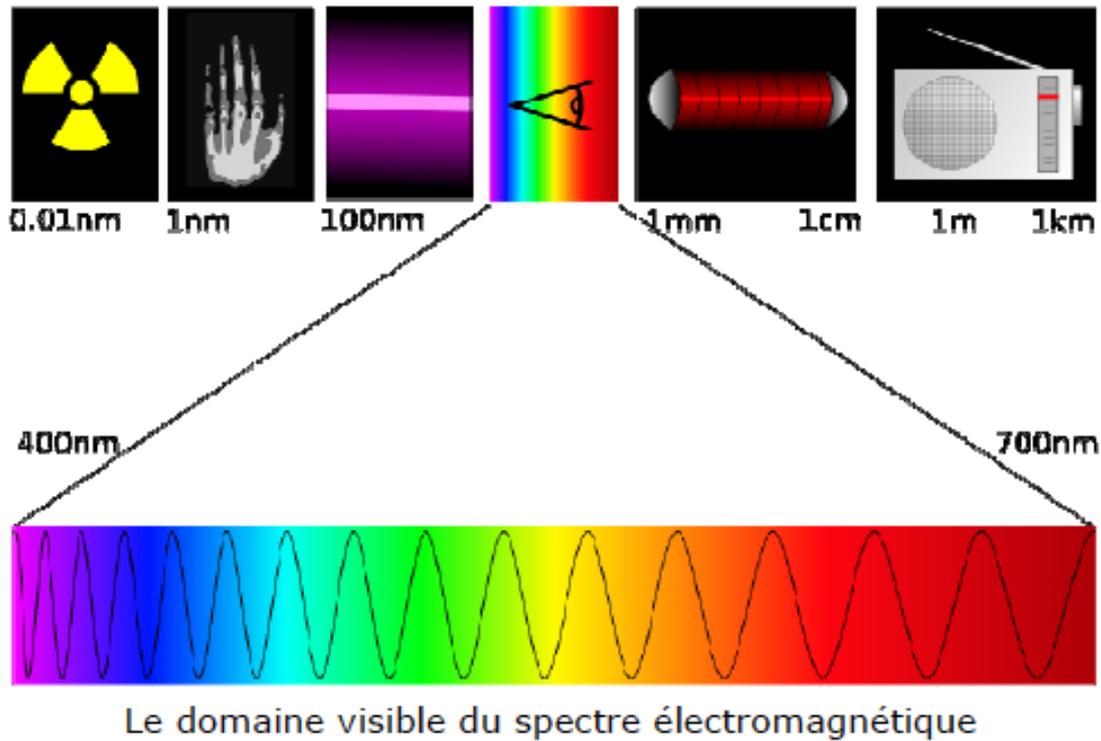


Figure 6 - Spectre électromagnétique[62].

La caractérisation moderne de la lumière révèle qu'elle a une double nature. Cela signifie que certaines qualités de la lumière sont mieux expliquées si nous décrivons la lumière comme étant constituée de particules en mouvement, souvent appelées photons ou quanta. Le concept quantique (corpuscule) permet de décrire les interactions énergétiques de la lumière avec la matière au niveau moléculaire. Une radiation lumineuse a des comportements des corpuscules appelés photons, ces photons ont la capacité de transporter une quantité d'énergie finie en fonction de la fréquence de la radiation [62].

La lumière infrarouge est une radiation de nature électromagnétique, elle est caractérisée par les quatre grandeurs décrivant les ondes électromagnétiques : la période, la fréquence, la longueur d'onde et le nombre d'onde. La lumière infrarouge possède aussi les caractéristiques de la lumière, à savoir la propagation, la réflexion, la réfraction, l'interférence, la diffraction, la diffusion et la polarisation. L'absorption de lumière par la matière conduit à des transitions de type vibrationnelles au niveau des molécules. La spectroscopie infrarouge s'intéresse à ces vibrations lorsque la matière est soumise précisément aux radiations infrarouges.

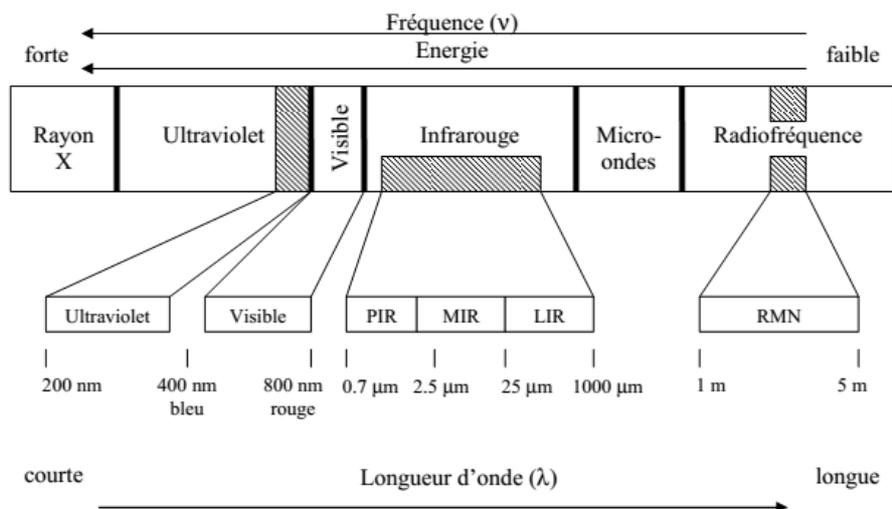


Figure 7 - Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique.

II.2.2. Principe de la spectroscopie infrarouge

Le principe de la spectroscopie infrarouge a été détaillé notamment par *Bertrand* [7] et *Rouessac* [63]. Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement infrarouge, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Les liaisons chimiques qui la composent doivent être considérées comme des oscillateurs anharmoniques, car une liaison n'est pas parfaitement élastique. La spectroscopie infrarouge est basée donc sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

La spectroscopie IR est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Généralement dans la majorité des spectroscopies optiques comme la spectroscopie de fluorescence, l'absorption d'énergie permet à un électron d'une liaison chimique de passer d'un état fondamental à un état excité. Dans le cas de la spectroscopie d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau infrarouge est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le rayonnement infrarouge fournit des quanta d'énergie pouvant provoquer la transition des électrons entre les niveaux de rotation et de vibration des liaisons atomiques mais ne peut pas provoquer des transitions entre les niveaux électroniques.

Généralement le domaine du moyen infrarouge correspond au domaine d'énergie de vibration de la majorité des molécules organiques et inorganiques.

II.2.3. Fondement théorique de la spectroscopie infrarouge

La première formule reliant la vitesse de lumière c , la longueur d'onde λ et la fréquence ν d'un rayonnement en mouvement dans le vide, est donnée par l'Équation 2 :

$$\text{Équation 2 : } \lambda = \frac{c}{\nu}$$

Les énergies qui constituent l'énergie interne d'une molécule (l'énergie éventuelle de translation, l'énergie de rotation, l'énergie de vibration et l'énergie électromagnétique) sont quantifiées. Elles ne prennent que des valeurs discrètes, et le photon émis sera absorbé par le matériau, s'il permet à la molécule constituant ce matériau de passer de l'état initial (E_1) à l'état excité supérieur (E_2). Le photon apporte l'énergie $h\nu$ qui est exactement égale à la différence d'énergie ($E_2 - E_1$) entre les deux états. Cette énergie est donnée par l'Équation 3 :

$$\text{Équation 3 : } \Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

Le rayonnement émis d'une manière continue, sera diminué à la fréquence (ν), et donc il est absorbé (apparition d'une bande d'absorption). L'analyse en spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'une lumière émise par le matériau à analyser. Il en résulte une absorption d'énergie au niveau des différentes liaisons moléculaires. L'intensité de la lumière absorbée ou transmise suit la loi de B er-Lambert illustrée dans l'Équation 4 :

$$\text{Équation 4 : } A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = K \cdot P \cdot C$$

Avec : $T = \left(\frac{I}{I_0}\right)$; A : absorbance ou densité optique ; T : transmittance ; P :  paisseur ou trajet optique ; K : constante fonction de l'analyte (extinction molaire) et C : concentration de la matière absorbante.

Dans la phase d'analyse, la mesure de l'intensité (I) se fait soit par rapport à l'air soit par rapport aux constituants de la matrice, excepté l'élément recherch e. Dans ces conditions, l'absorbance est donnée par l'Équation 5 :

$$\text{Équation 5 : } A = \log\left(\frac{1}{T_{éch}}\right) - \log\left(\frac{1}{T_{std}}\right) = \log\left(\frac{T_{std}}{T_{éch}}\right)$$

Avec : T_{std} : Transmittance dans l'air ou le blanc (référence) et $T_{éch}$: transmittance dans l'échantillon.

II.2.4. Vibrations des molécules

D'après *Banwell* [64], la spectroscopie vibrationnelle étudie la réponse de la matière lorsqu'elle est irradiée par des ondes électromagnétiques dans le domaine d'ultraviolet, du visible et d'infrarouge. Lorsqu'une molécule est irradiée par la lumière, elle va absorber de l'énergie pour passer d'un état d'énergie dite initial à un état d'énergie excité dite supérieur. Les transitions qui sont observées au cours du phénomène d'absorption : une transition électronique caractérisé par le passage d'un électron à une orbite supérieure, une transition vibrationnelle où il y'a une augmentation de l'amplitude de vibration entre les atomes et une transition rotationnelle dont une modification de la vitesse de rotation des molécules sur elles-mêmes.

Les types de bandes de vibrations sont des bandes fondamentales qui sont enregistrées dans le moyen infrarouge et elles résultent du passage d'un niveau initial au premier niveau excité. Les bandes harmoniques se retrouvent dans le proche infrarouge, elles correspondent au passage de l'état initial aux niveaux énergétiques supérieurs [65]. Les bandes de combinaison sont le troisième type et sont aussi présents dans le proche infrarouge, elles résultent soit de la somme ou de la différence de deux vibrations fondamentales.

La condition principale pour qu'une molécule interagisse avec un rayonnement infrarouge (IR) est que la molécule forme un dipôle. Ce dernier a lieu si la molécule comporte des atomes de charges différentes. Si c'est le cas, la molécule forme un dipôle continu et la liaison chimique est dite polaire. Le moment dipolaire μ est donné par l'Équation 6:

$$\text{Équation 6: } \vec{\mu} = q \cdot \vec{d}$$

Avec : q est la charge absolue portée par chacun des deux atomes et d est la distance entre les atomes.

La molécule est qualifiée d'active en infrarouge s'il y a un changement du moment dipolaire. Les charges électriques des molécules homonucléaires (constituées de deux atomes identiques) sont les mêmes. Les centres de gravité des charges sont superposés. Dans ce cas, le moment dipolaire est égal à zéro même si la molécule est en vibration. Donc, la molécule est inactive en infrarouge.

Les bandes d'absorption sont apparues à la suite de la diminution de l'énergie de la lumière infrarouge, après avoir interagit avec la matière. Le MIR comporte la majorité des bandes d'absorptions. Les fréquences de vibration [66] sont en fonction de la masse réduite de la molécule (μ) et la constante de force de liaison (k), ainsi que d'autres facteurs à savoir, la conformation des molécules, l'électronégativité des atomes environnants, les liaisons dihydrogène et les effets stériques. La **Figure 8** représente des modes de vibrations moléculaires.

Les variations vibrationnelles et rotationnelles sont les formes d'absorption des rayonnements infrarouge, au sein de la molécule. En général, deux types de vibrations peuvent être mis en œuvre :

- L'élongation où deux atomes s'éloignent l'un de l'autre.
- La déformation (flexion) provoque une modification des angles de liaison et qui comporte le cisaillement, le balancement, la rotation plane et la torsion.

Généralement, les élongations sont situées dans une gamme de nombres d'onde supérieure à celle des déformations [67]. Pour simplifier la présentation de la théorie vibrationnelle, on va voir d'abord, le modèle le plus simple qui considère une molécule diatomique en vibration et ensuite étudier le modèle poly-atomique.

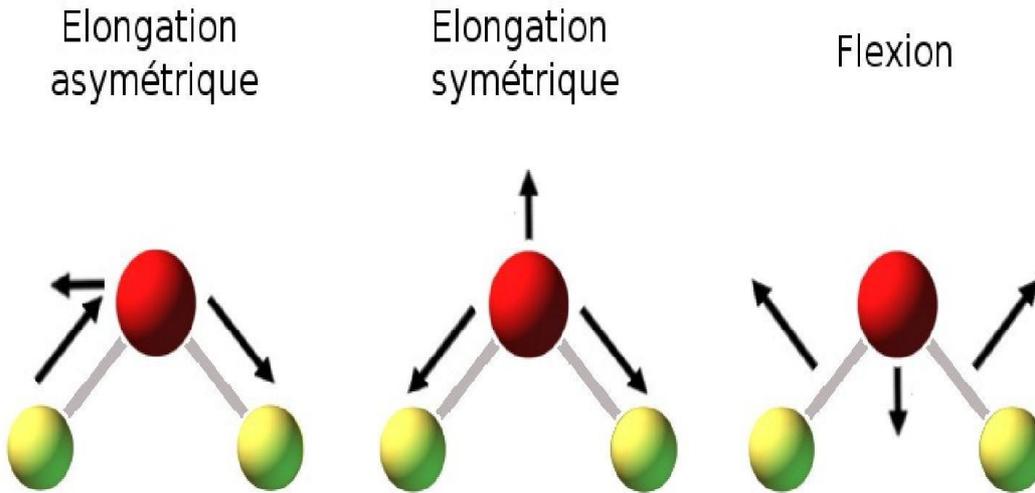


Figure 8 - Modes de vibrations moléculaires.

II.2.4.1. Le modèle diatomique

Le modèle diatomique se modélise par deux masses m_A et m_B constituant la liaison moléculaire. Dans ce cas, une élongation de la molécule est le seul mode de vibration possible. L'énergie de transition entre les niveaux de vibration peut prendre la valeur E donnée par l'Équation 7:

$$\text{Équation 7 : } E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(N + \frac{1}{2} \right)$$

Avec : N est le nombre quantique de vibration ($N = 0, 1, 2, \dots$), k la constante de force de la liaison (en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) et μ la masse réduite exprimée en Kg, et elle est donnée par l'Équation 8:

$$\text{Équation 8 : } \mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

Avec : m_A et m_B étant les masses des deux atomes de la liaison.

Il est admis que les liaisons sont parfaitement élastiques dans ce modèle. Alors que, si l'amplitude des vibrations devient importante, ces liaisons peuvent se briser [67]. Par conséquent, la forme d'énergie E sera plus compliquée que celle donnée par l'Équation 7.

II.2.4.2. Modèle poly-atomique

Dans le modèle poly-atomique, plusieurs modes de vibrations sont permis : L'élongation des liaisons, déformation des angles et la déformation hors plan.

Une molécule contenant N atomes aura $3N-6$ degrés de liberté de vibration et $3N-5$ pour les molécules linéaires. Généralement, les liaisons moléculaires n'absorbent pas l'énergie lumineuse infrarouge, même si la fréquence de la lumière incidente correspond à la fréquence propre de la liaison. Seulement les liaisons, qui présentent un moment électrique dipolaire non nul, sont actives dans l'infrarouge.

II.3. Spectroscopie Moyen Infrarouge (MIR)

II.3.1. Caractéristique de la spectroscopie moyen infrarouge

En spectroscopie infrarouge, on s'intéresse aux différentes vibrations des liaisons. La spectroscopie MIR est caractérisée par une résolution fine des pics qui lui confère plusieurs avantages. Tout d'abord, la finesse des raies permet d'identifier facilement le type de liaison rencontré et même de quantifier un composé en fonction de l'intensité des signaux. Un autre avantage important des spectres MIR est qu'ils apportent des informations sur l'état physico-chimique de différents composants comme la cristallinité, l'oxydation, ou encore la phase, qui peuvent être utiles pour étudier les changements causés par le traitement ou le stockage [8].

Les applications MIR en agroalimentaire se développe, suite à l'apparition d'appareils basés sur la transformée de Fourier et de nouveaux dispositifs de présentation des échantillons plus pratiques [62]. Plusieurs problèmes d'authentification ont été étudiés par ce type de méthode ; par exemple la quantification des adultérants de l'huile d'olive [68], ou encore la discrimination des différents types de fruits dans les purées [69] ou les confitures [70], et enfin la discrimination des différentes variétés de café [71,72]. Au niveau du contrôle qualité de la production, une étude polonaise [73] s'est intéressée à l'évolution de la teneur en phospholipides lors de la production d'huile de colza.

II.3.2. Interprétation d'un spectre moyen infrarouge

Généralement, le spectre MIR est constitué de bandes d'absorption qui proviennent des modes de vibration des groupements fonctionnels fondamentaux. L'interprétation des spectres est faite d'une façon empirique, autrement dit, elle consiste le plus souvent, à comparer les résultats obtenus avec ceux cités dans la bibliographie. Cette dernière est fondée essentiellement sur l'analyse des molécules isolées par spectroscopie MIR. La position des bandes est en fonction de la nature de liaison (vibrateur) et son environnement

Les liaisons entre atomes plus lourds vibrent à plus basse fréquence, alors que les liaisons entre atomes légers vibrent à plus haute fréquence. Selon la loi de *Hook* (**Équation 9**), la fréquence ν et la masse réduite μ sont inversement proportionnelle.

$$\text{Équation 9 : } \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{avec} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Avec k : constante de la force de liaison et m_1 et m_2 : masses des atomes liés.

L'intensité de la bande d'absorption est variable en fonction de la concentration, de la nature et de la polarité de la liaison. La fréquence de vibration est influencée par de nombreux facteurs externes ou internes à la molécule (taille et électronégativité des atomes environnants, liaisons hydrogène, effet stérique et conformation). Ces facteurs sont considérés comme un avantage, parce qu'ils permettent une forte sélectivité et par conséquent, facilitent l'analyse et l'identification spectrale [74].

D'une manière indépendante de leurs environnements, des groupements fonctionnels absorbent habituellement, la lumière infrarouge dans la même région. Ainsi, les vibrations d'élongation caractéristiques de la liaison C-H apparaissent presque toujours entre 3200 et 2800 cm^{-1} , les vibrations d'élongation du carbonyle (C=O) entre 1800 et 1600 cm^{-1} , alors que les bandes des cycles aromatiques apparaissent en deçà de 1000 cm^{-1} .

En général, le spectre moyen infrarouge est divisé en quatre régions [75]:

- La région qui s'étend de 3700 à 2500 cm^{-1} est nommée région d'élongation d'hydrogène parce que les vibrations d'élongation des liaisons C-H, O-H, et N-H apparaissent dans cet intervalle de nombres d'onde.
- La région d'élongation des doubles liaisons allant de 2000 à 1600 cm^{-1} et on y trouve les bandes des liaisons C=C, C=O, et C=N.
- La région étalant de 1600 à 1000 cm^{-1} est la région d'empreinte digitale. Cette région est très complexe et difficile à interpréter à cause du grand nombre de bandes d'infrarouge qui s'y trouvent (les vibrations d'élongation des liaisons simples C-O, C-C et C-N, vibrations de déformation de la liaison C-H, et quelques bandes relatives aux cycles de benzène). L'utilité de ce dernier est que les nombreuses bandes peuvent servir comme une empreinte digitale pour des molécules.
- La région allant de 1000 à 400 cm^{-1} , est appelée parfois la région aromatique, car les bandes intenses caractéristiques des cycles de benzène sont présentes dans cette région.

II.4. La spectroscopie proche infrarouge (PIR)

II.4.1. Bandes harmoniques et bandes de combinaison dans le proche infrarouge

Les premiers spectres en proche infrarouge sont enregistrés en 1881, mais sa découverte peut être attribuée à *William Herschel* pour son travail présenté en avril 1800 "*Experiments on the Refrangibility of the invisible Rays of the sun*". Les domaines de longueur d'onde de rayonnement en proche IR s'étendent de 4000 à 12000 cm^{-1} . Les vibrations des liaisons interatomiques moléculaires n'obéissent pas exactement aux lois décrites par le modèle harmonique. La liaison interatomique qui vibre généralement à plusieurs fréquences (fondamentales, harmoniques), est l'important résultat de l'anharmonicité. La localisation des bandes harmoniques est en général légèrement inférieure à un multiple entier de la fréquence fondamentale.

En plus des bandes harmoniques, il en résulte une absorption due à l'interaction de deux ou plusieurs modes de vibration pour un même groupement fonctionnel : les bandes de combinaison. Dans ces transitions, la lumière excite deux ou plusieurs vibrations simultanément et induit donc une transition à une fréquence presque égale à la somme des fréquences de ces transitions [76]. Ainsi, les bandes d'absorption sont des bandes fondamentales pour les liaisons chimiques telles que C-H, N-H, O-H.... dans le moyen infrarouge (une bande par liaison). Et ce sont des bandes harmoniques de ces mêmes liaisons qui sont présentes dans le proche infrarouge (plusieurs bandes pour une même liaison).

II.4.2. Absorptions spécifiques dans le proche Infrarouge (PIR)

Les groupements chimiques présentant une absorption dans la région du PIR sont principalement de la forme X-H, avec X correspondant aux atomes de carbone, d'oxygène, de soufre ou d'azote et H correspond à l'atome d'hydrogène (**Figure 9**).

Les bandes d'absorption en PIR sont caractérisées par des pics larges et sont souvent exprimées en nanomètres. Par conséquent, une petite variation dans l'échelle des longueurs d'onde ne changerait pas fortement l'intensité du rayonnement absorbée. Ce qui constitue un avantage pour les applications analytiques qui sont basées sur la mesure de la lumière absorbée en fonctions des longueurs d'onde.

Les bandes de combinaisons et les bandes harmoniques constituent le cœur de la spectroscopie PIR, alors que l'anharmonicité détermine la fréquence et l'intensité des bandes. Les liaisons interatomiques ayant l'anharmonicité la plus grande, sont celles qui mettent en jeu l'atome d'hydrogène. Les vibrations de ces liaisons sont caractérisées par une énergie élevée et une large amplitude [77,78].

La spectroscopie proche infrarouge (PIR) a été abandonnée par beaucoup de spectroscopistes "classiques". Ils travaillent avec les bandes d'absorption fondamentales qui se trouvent dans la région du moyen infrarouge (MIR), les chercheurs pensaient que les bandes d'harmoniques et de combinaisons observées dans le PIR (entre 700 et 2500 nm ou bien entre 14300 et 4000 cm^{-1}) étaient sans importance. Dans les années 1950, *Karl Norris* [79] a développé les instruments nécessaires pour étudier les propriétés de la spectroscopie PIR des matériaux biologiques intacts. *Norris*, est le premier à avoir montré les intérêts de la régression multilinéaire pour extraire l'information utile à partir des spectres PIR, dans le but de déterminer la composition d'un échantillon [79]. Généralement, en spectroscopie PIR, les pics sont plus larges et donc leurs résolutions sont moins bonnes. Il est donc impossible de quantifier un composé en fonction de l'intensité d'un pic et par conséquent, on fait souvent appel à la chimiométrie pour développer des modèles plus complexes [79].

II.4.3. Avantages et inconvénients de la spectroscopie PIR

La spectroscopie PIR est une analyse qui fait partie de la spectroscopie vibrationnelle. Cette technique rapide qui ne nécessite aucune préparation d'échantillon possède un coût d'analyse peu élevé. En plus cette technique est adaptée aux analyses in situ en temps réel et même pour des analyses à distance avec l'utilisation des fibres optiques. Ceci lui permet d'être une méthode de choix pour les analyses de routine à l'échelle industrielle.

Cependant, cette technique ne permet pas l'interprétation des spectres et donc ne permet pas d'établir des corrélations structurales sur la base des pics. Et pour les cas des mélanges cette méthode nécessite une phase d'étalonnage longue et délicate.

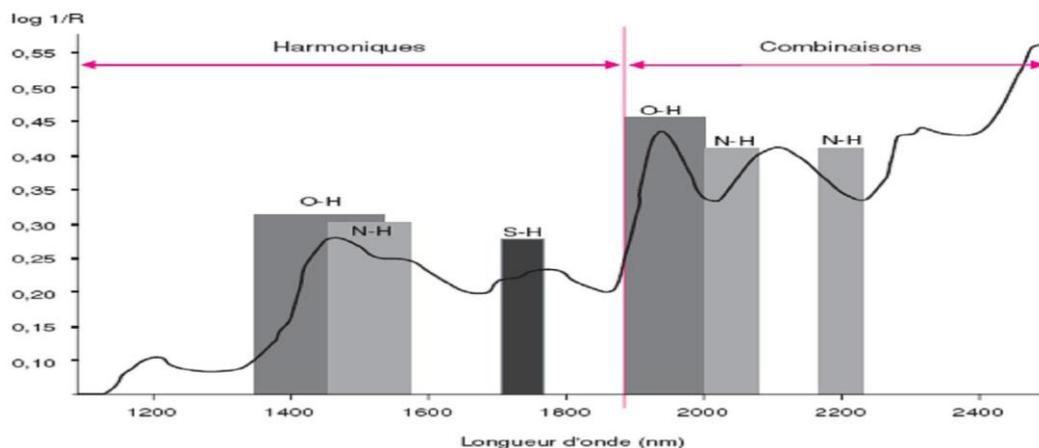


Figure 9 - Exemples de bandes d'absorption dans le proche infrarouge.

II.5. Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

II.5.1. Spectromètre dispersif

Les spectromètres dispersifs sont les premiers appareils conçus. Leur conception date des années 40 pour répondre à l'utilisation de la spectroscopie infrarouge en laboratoires pour caractériser les composés organiques [8]. Ce type d'appareil est conçu selon le schéma de principe représenté par la **Figure 10**.

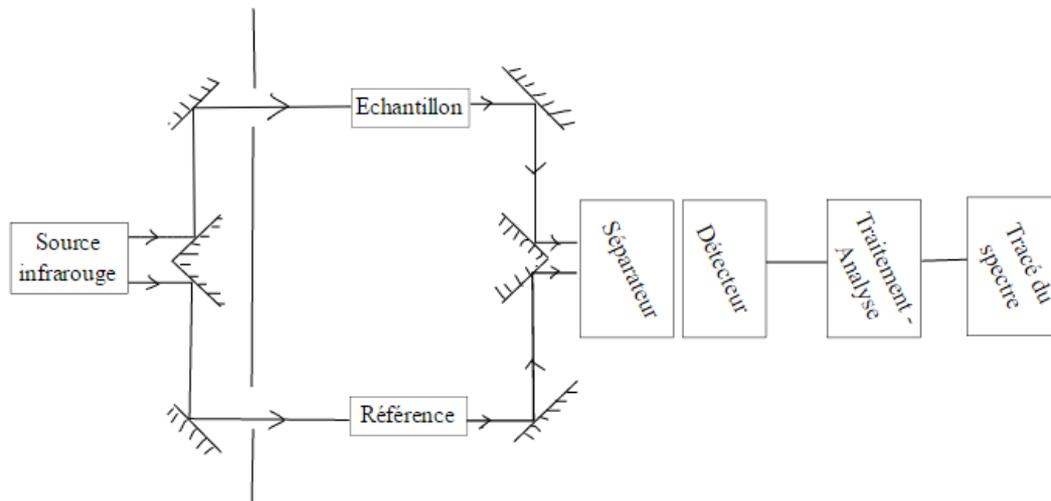


Figure 10 - Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge dispersif.

Dans les spectromètres infrarouges classiques ou dispersifs, le rayon de la lumière infrarouge est séparé en deux. Un rayon passe par l'échantillon à analyser et l'autre par la référence et avant d'arriver au détecteur le rayon passe par un système de dispersion. Le but de ce dernier est de séparer les fréquences de l'énergie émise à partir de la source. La dispersion des fréquences de l'énergie est réalisée soit à l'aide d'un prisme (en chlorure de sodium utilisable jusqu'à 650 cm^{-1} ou en bromure de potassium utilisable jusqu'à 400 cm^{-1}) ou à l'aide d'un réseau de diffraction (bloc de silice sur lequel on a gravé des traits, métallique en surface). Le spectre est obtenu après comparaison des signaux [8].

L'intérêt de l'utilisation de la référence dans ce système est d'éviter les fluctuations des signaux qui peuvent avoir lieu avec le vieillissement de la source infrarouge. Pour éviter la prise en compte du solvant dans l'interprétation des résultats, la référence correspond habituellement au solvant qui a servi à la dissolution de l'échantillon à analyser.

Cependant, cette technique est reprochée par sa lenteur, sa relative insensibilité et sa complexité mécanique.

II.5.2. Spectromètre non dispersif

II.5.2.1. Description d'un spectromètre IR-TF

Un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier comporte quatre parties essentielles [80] :

- Une source lumineuse : pour notre cas, le Globar est utilisé pour le moyen infrarouge. Il est constitué d'un bâtonnet en carbure de silicium (SiC) et fonctionne à des températures de l'ordre de 1500°C.
- Un dispositif permettant de générer les interférences : l'interféromètre de Michelson pour l'IR-TF.
- Un système de présentation de l'échantillon : ce système dépend de la technique spectroscopique employée.
- Un ou plusieurs capteurs photosensibles : le spectromètre utilisé comporte un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellure). Il est constitué d'un monocristal en alliage de mercure cadmium tellure déposé sur un support inerte. Pour une plus grande sensibilité, ce détecteur est maintenu à la température de l'azote liquide (77 K).

II.5.2.2. Fonctionnement du spectromètre IR-TF

Le principe de fonctionnement est basé sur l'interaction rayonnement-matière. Sous l'effet d'un rayonnement incident, une molécule absorbe de la lumière pour passer d'un niveau d'énergie initial E_1 à un niveau supérieur E_2 . On parle de spectroscopie infrarouge lorsqu'il y a seulement, une modification des énergies vibrationnelles et rotationnelles des molécules.

Une vue générale d'un spectrophotomètre IR-TF est présentée par la **Figure Error! Unknown switch argument.** L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier [81,82] qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et qui mesure les longueurs d'onde absorbées et les intensités de l'absorption. Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre, le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est-à-dire une signature de l'intensité en fonction de la position 'u miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier.

La spectroscopie par transformation de Fourier s'est immédiatement imposée comme étant la meilleure technique par rapport à ses concurrentes de l'époque, du fait des nombreux avantages qu'elle offre.

Multiplexage (avantage e Fellgett) : Le premier d'entre eux est certainement la possibilité d'enregistrer simultanément un large domaine spectral d'analyse à l'aide d'un unique détecteur, limité seulement par l'étendue spectrale de la source utilisée. Il est connu sous le nom d'avantage multiplex ou bien de *Fellgett* [83,84].

Étendue (avantage d Jacquinot) : Le deuxième avantage de la méthode, connu sous le nom d'avantage de *Jacquinot*, est celui de l'étendue géométrique. À limite de résolution identique, le spectromètre par transformation de Fourier possède une pupille d'entrée de surface plus grande que les spectromètres dispersifs utilisant une fente. La quantité de lumière transmise à travers l'instrument est donc plus importante avec un spectromètre de Fourier, ce qui permet la réduction du temps de mesure de un ou deux ordres de grandeurs [85].

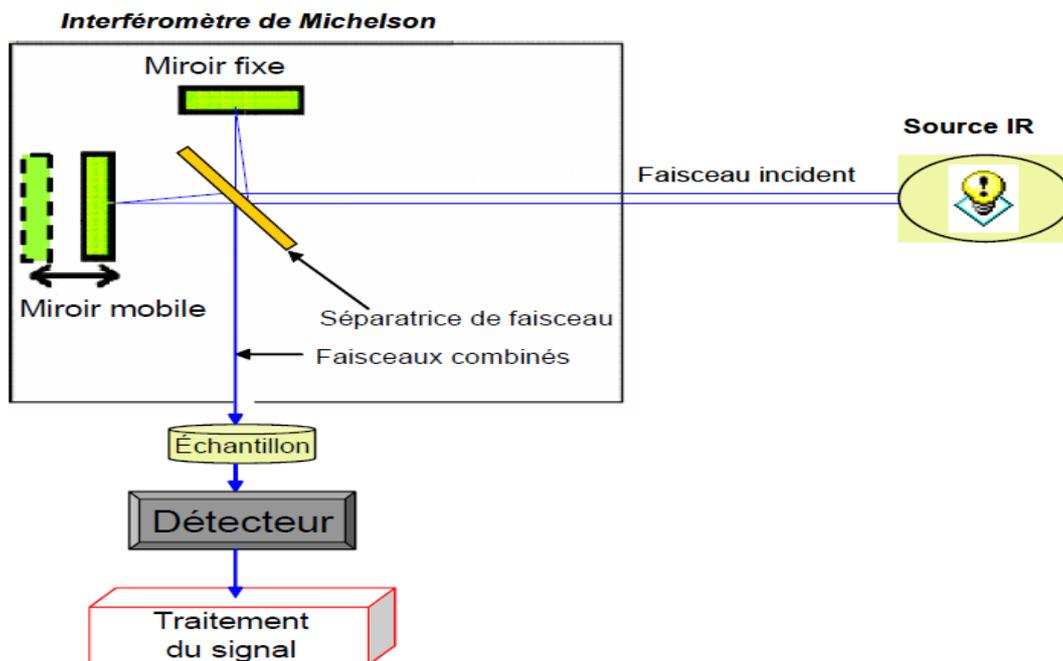


Figure Error! Unknown switch argument. - Schéma d'un spectromètre avec interféromètre de Michelson.

II.5.2.3. Avantages et limites de la spectroscopie IR-TF

Pouvoir d résolution : Un autre avantage est la limite de résolution atteignable avec les spectromètres par transformation de Fourier. Elle dépend de la différence de marche qu'il est possible d'introduire entre les deux bras de l'interféromètre, et peut être jusqu'à 1 000 fois meilleure qu'avec les spectromètres dispersifs. De très bonnes limites de résolution ($9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) sont d'ailleurs démontrées dès 1977 [86], en utilisant un interféromètre dont la différence de marche maximale est de 6 m.

Avantage de Connes : La présence du laser hélium-néon permet une mesure très précise des nombres d'onde ce qui, associé à l'avantage de *Fellgett*, assure une calibration uniforme sur tout le spectre.

Fonction instrumentale : Elle est déterminée par la fonction d'apodisation et la dimension de l'iris et peut donc être connue très précisément (pour autant que l'alignement optique soit parfait).

Les deux limitations principales de la spectroscopie par transformation de Fourier sont l'utilisation de l'interféromètre de Michelson et de sources lumineuses incohérentes.

L'interféromètre, du fait de la course du miroir limitée, possède une différence de marche finie, ce qui limite la résolution susceptible d'être atteinte par l'instrument. Dans ces conditions, mesurer un spectre à haute résolution avec ce type d'instrument requière un coût et un encombrement conséquent. L'utilisation de sources incohérentes limite la sensibilité de la technique, et impose des temps d'acquisitions de plusieurs minutes, voire même plusieurs heures, pour enregistrer des spectres à haute résolution et avec un bon rapport signal sur bruit. La sensibilité étant un aspect très important pour de nombreux domaines d'applications, cette limitation en fait un système mal adapté pour l'observation de phénomènes rapides ou de faible intensité.

Il est cependant possible d'améliorer la sensibilité de détection en allongeant le parcours optique de la source lumineuse dans l'échantillon sondé. Un bon exemple étant les cuves multipassages, comme celle de *White* [87]. La longueur d'interaction peut devenir alors de quelques centaines de mètres [88], et permet d'atteindre des sensibilités de l'ordre de 10^{-7} cm^{-1} [89]. Toutefois, l'amélioration de la longueur d'absorption par rapport à la longueur de base de la cuve reste faible du fait de l'utilisation d'une source incohérente, et les grandes dimensions de telles cuves présentent des inconvénients (difficultés à contrôler la température ou la pression) et rendent le système plus encombrant et inadapté à des applications embarquées.

II.5.2.4. Réflexion totale atténuée (ATR)

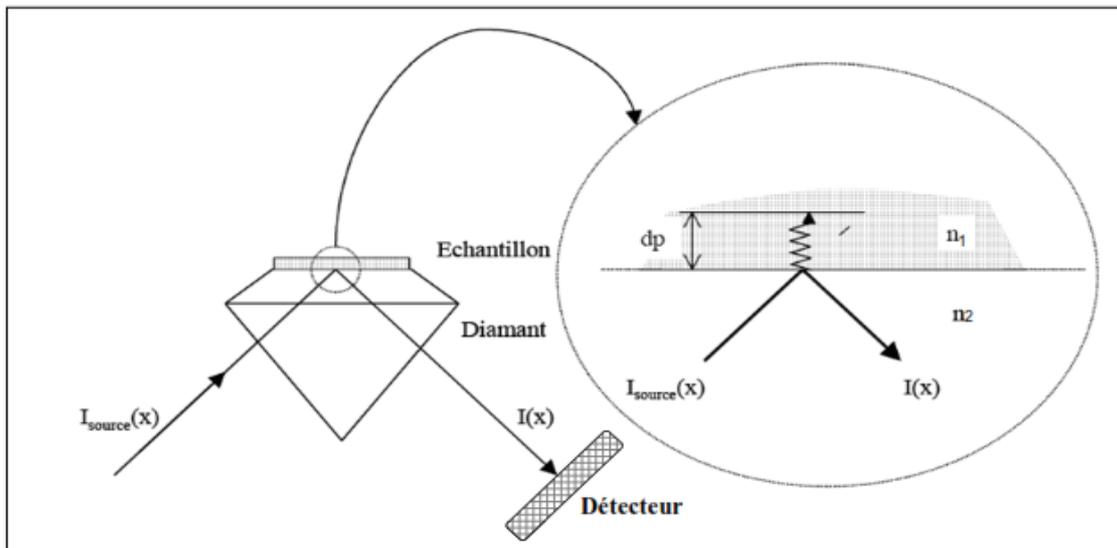


Figure Error! Unknown switch argument. - Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur diamant.

La technique d'ATR est connue sous différents noms. Les plus fréquents sont ATR (*Attenuated Total Reflectance*), FMIR (*Frustrated Multiple Internal Reflexion*) et MIR (*Multiple Internal Reflectance*). La technique d'ATR a été introduite par *Harrick* en 1967 [90]. Lorsque la lumière pénètre d'un milieu M_1 vers un Milieu M_2 , celle-ci est diffractée selon la loi des sinus. Si M_1 est plus réfringent que M_2 , alors il existe un angle θ_c dit angle critique, au-delà duquel la lumière n'est plus réfractée, mais subie une réflexion totale. Le principe de l'ATR est détaillé sur la **Figure Error! Unknown switch argument..**

L'échantillon est mis sur un cristal transparent en infrarouge, mais avec un indice de réfraction élevé (ZnSe, Diamant, Germanium) appelé élément à réflexion interne. $I_{source}(x)$ est l'intensité globale diffusée par la source en fonction du retard. Alors que, $I(x)$ est l'intensité après réflexion sur l'échantillon.

Le cristal est caractérisé par sa haute résistance et par l'indice de réfraction qui est généralement élevé ($n_2=2,43$ pour le diamant par exemple), dans la majorité des cas il est supérieur à celui de l'échantillon (n_1). En première approche, d'après la loi de *Descartes*, la lumière IR initiale traverse le cristal (diamant dans l'exemple) et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon puis orientée vers le détecteur [91]. En réalité, l'existence d'une onde progressive appelée évanescente peut perturber ce phénomène. En effet, la lumière pénètre de quelques micromètres dans l'échantillon qui est en contact direct avec le cristal. Par conséquent, une partie de l'énergie lumineuse est retenue et la réflexion totale est dite atténuée [92].

La profondeur de pénétration (dp) des ondes évanescentes dans l'échantillon est en fonction de la longueur d'onde λ , de l'angle α d'incidence du faisceau par rapport à la normale à l'intérieur du cristal et des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon nommés respectivement n_2 et n_1 . La profondeur de pénétration est donnée par la formule de *Harrick*, par l'Équation 10:

$$\text{Équation 10 : } dp = \frac{\lambda}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2 \alpha - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

La profondeur de pénétration est la même pour des échantillons ayant le même indice de réfraction, ce qui permet de comparer aisément des matériaux de même nature.

II.6. Analyse des données infrarouges

Les spectres IR sont riches en informations utiles qui expliquent les caractéristiques chimiques, physiques et biochimiques des échantillons analysés, néanmoins ces informations peuvent être parfois

difficiles à extraire. L'utilisation des méthodes mathématiques, informatiques et d'analyse statistique multivariée constitue une autre méthode, permettant l'extraction et l'exploitation de l'information cachée dans les spectres infrarouges.

Les méthodes spectroscopiques sont très employées pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants de produits agroalimentaires [62]. En général, quand les spectres sont bien clairs et non superposés, on peut calculer une concentration à partir de l'intensité du signal. Cependant, lors de l'analyse de matrices complexes, les signaux ne sont pas toujours bien définis. Par conséquent, il n'est pas facile d'identifier et de quantifier les différents constituants.

Pour rester dans l'objectif de l'analyse spectrale, qui est d'avoir des résultats d'analyse d'une manière rapide sur différents composants, il est alors nécessaire d'utiliser les méthodes chimiométriques pour extraire de l'information pertinente.

III. La chimiométrie

La chimiométrie est la discipline de la chimie analytique qui utilise les méthodes mathématiques, statistiques et les outils informatiques pour extraire des informations utiles contenues dans les données de mesures expérimentales [93]. Cette discipline a trois objectifs principaux [94] :

- Le premier est la planification et l'organisation des expériences pour avoir le maximum d'information avec le minimum des essais : plans d'expériences [95].
- Le second objectif est la description et l'exploration des données sous forme synthétique : l'analyse en composantes principales (ACP) est l'une des méthodes descriptives exploratoires [96].
- Enfin, son dernier objectif est la prédiction, soit de valeurs continues tel que les méthodes de régression comme la PLS [97], soit de classer avec une analyse discriminante comme la PLS-DA [98].

III.1. Prétraitements des données

D'une manière générale, la qualité de l'échantillon [99] et les variations du chemin optique affectent considérablement les spectres infrarouges. Pour éliminer ou diminuer ces interférences, on fait appel à des prétraitements mathématiques qu'on applique aux spectres.

Les étapes de prétraitement interviennent avant l'établissement du modèle prédictif. Les prétraitements ont deux objectifs principaux : l'amélioration du signal, et la condensation des données pour extraire l'information pertinente. Les prétraitements visant à améliorer le signal sont, évidemment, en relation avec le mode ultérieur d'exploitation des données spectrales. Ils incluent :

- La réduction du bruit dans les spectres ;
- L'élimination de l'effet des déformations de la ligne de base ;
- L'affinage de la position des bandes d'absorption ;
- L'élimination des variations d'intensité globale sans intérêt.

III.1.1. Données centrées

Ce prétraitement consiste à soustraire à chaque valeur de la matrice la valeur moyenne de sa variable.

$$XC(n, m) = \begin{pmatrix} X_{11} - \bar{X}_1 & X_{12} - \bar{X}_2 & \dots & X_{1m} - \bar{X}_m \\ X_{21} - \bar{X}_1 & X_{22} - \bar{X}_2 & & X_{2m} - \bar{X}_m \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{n1} - \bar{X}_1 & X_{n2} - \bar{X}_2 & \dots & X_{nm} - \bar{X}_m \end{pmatrix}$$

Avec : n est le nombre d'échantillons et m est le nombre de variables.

Avec ce type de traitement, on élimine les différences entre variables attribuées à la magnitude de l'échelle.

III.1.2. Données centrées normées (ou centrées réduites)

Ce prétraitement consiste à soustraire à chaque élément de la matrice la valeur moyenne de sa valeur et on divise le résultat par l'écart-type de la variable.

- La moyenne de toutes les variables d'une matrice centrée normée est de 0.
- L'écart-type de toutes les variables est de 1.

Avec ce type de traitement, on élimine les différences entre variables attribuées à la magnitude et amplitude de l'échelle.

III.1.3. Centrage par colonne

Le centrage par colonne est un prétraitement, qui est presque toujours appliqué sur des données spectrales. Généralement, dans une matrice, chaque longueur d'onde est représentée par une colonne. Le centrage par colonne est une opération qui consiste à soustraire la valeur moyenne pour chaque colonne, pour chaque longueur d'onde [99].

III.1.4. Centrage par ligne

Dans une matrice et par convention, chaque ligne est représentée par un échantillon. Ce prétraitement consiste à soustraire les moyennes des lignes de la matrice X de données originales pour réduire les fluctuations de ligne de base dans les spectres. Chaque spectre est traité séparément. Cette méthode est habituellement appliquée quand il y a des difficultés dans la reproductivité des conditions d'acquisition [100].

III.1.5. Dérivées

La méthode de dérivation consiste à i) corriger les effets de la ligne de base [101] dans les spectres et par conséquent, ii) éliminer les effets non chimiques et iii) à créer d's modèles d'étalonnage robustes. La dérivation peut également aider à résoudre des bandes superposées qui peuvent fournir une meilleure compréhension des données, mettant l'accent sur les petites variations spectrales dans les données brutes.

La dérivation a été historiquement le premier prétraitement utilisé. Il existe différentes méthodes pour calculer la dérivée :

- La dérivée par intervalle « gap dérivative » calcule la dérivée sur un intervalle de points fixés par l'utilisateur.
- La dérivée basée sur la technique de convolution de *Savitsky Golay* [101]. Deux étapes sont nécessaires pour calculer la dérivée en un point i : tout d'abord, un polynôme de degré k est ajusté sur au moins $k+1$ points du spectre autour du point i . Ensuite, la dérivée du polynôme en ce point est calculée.

III.1.6. Correction Multiplicative de diffusion (MSC)

La Correction de Scatter multiplicatif (MSC) [99] est une méthode de transformation utilisée pour compenser additif et/ou effets multiplicateurs dans les données spectrales. MSC est également connu sous le nom de correction de signal multiplicatif. Elle a été conçue à l'origine pour faire face à la diffusion multiplicative dans la spectroscopie de réflectance.

Pour effectuer ce traitement, il est nécessaire d'avoir un spectre de référence. Par défaut c'est le spectre moyen des spectres qui joue ce rôle. Ainsi, les coefficients de correction sont calculés à partir d'une régression de chaque spectre individuel sur le spectre moyen. Le coefficient a est l'ordonnée à l'origine de la droite de régression et le coefficient b est la pente. Un modèle linéaire est établi entre le spectre et le spectre de référence selon l'Équation 11 :

$$\text{Équation 11 : } X_i = a + b\bar{X}_i + e_i$$

Avec : a et b sont les coefficients du modèle et e_i c'est l'erreur à la longueur d'onde i .

La valeur corrigée est ensuite calculée à partir de l'Équation 12:

$$\text{Équation 12 : } X_{MSC, i} = (X_i - a)/b$$

III.1.7. Déviation Normale Standardisée «Standard Normal Variate : SNV»

La SVN est une transformation dite individuelle qui élimine les effets de dispersion. Elle s'applique au spectre individuellement sans avoir besoin d'un spectre de référence [99]. Elle consiste à retrancher de chaque mesure la moyenne du spectre et à la diviser par son écart-type. De ce fait, elle ne s'applique pas aux données non-numériques.

Le prétraitement SNV (Standard Normal Variate) réduit très fortement les variations d'intensité générale des spectres [100]. Les données spectrales sont centrées et réduites selon l'Équation 13 :

$$\text{Équation 13 : } X_{SNV, i} = (X_i - \bar{X})/$$

Avec : X_i est la valeur du $\log\left(\frac{1}{R}\right)$ à la longueur d'onde i , w est le nombre de longueurs d'onde, \bar{X} est la valeur moyenne du $\log\left(\frac{1}{R}\right)$ et $X_{SNV, i}$ est la valeur corrigée à la longueur d'onde i .

De nombreuses études ont montré que l'utilisation des normalisations MSC et SNV permettent d'améliorer les résultats de l'analyse quantitative [102].

III.2. Méthodes exploratoires (non-supervisées)

Les méthodes exploratoires ont comme principal objectif de décrire les données, et ce sans introduction des connaissances a priori sur la collection des échantillons. D'où la nomination de non-supervisées. En spectroscopie ont fait appel à ces méthodes pour apprécier la structure des données et détecter la présence de spectres aberrants. Elles permettent aussi de s'assurer que les échantillons inconnus à analyser sont de même nature que ceux qui sont utilisés dans l'élaboration du modèle.

III.2.1. Analyse en composantes principales : ACP

L'analyse en composantes principales (ACP) [103] est la base de nombreuses méthodes de l'analyse multivariée. C'est une méthode qui tente à trouver les directions de plus grande variabilité des individus dans l'espace des composantes principales. L'ACP permet de déterminer les caractéristiques principales des spectres, de les comparer entre elles et de mettre en évidence des liens entre les variables descriptives (les absorbances aux différentes longueurs d'onde) [102].

L'ACP projette le nuage de points dans un espace de représentation de faibles dimensions [104]. Elle calcule de nouvelles variables, appelées composantes principales qui sont des combinaisons linéaires des absorbances de départ.

Puisque l'objectif de l'analyse est la simplification, il faut choisir la dimension de l'espace de représentation en effectuant un compromis entre deux objectifs contradictoires : prendre un espace de faibles dimensions et conserver une variance expliquée maximale.

- Le centre de gravité du nuage de points est calculé. Il s'agit du point ayant pour coordonnées les moyennes des coordonnées des individus. Les données sont centrées, ce qui correspond à une translation du repère. Ainsi, l'origine du nouveau repère est le centre de gravité du nuage initial.
- Le premier axe principal est la droite passant par l'origine qui restitue le maximum d'inertie, c'est-à-dire le maximum de variance. Le deuxième axe est orthogonal au premier, passant par l'origine qui approxime le mieux les données, c'est-à-dire, qui exprime le mieux la variance résiduelle. Les composantes suivantes sont déterminées de la même façon.
- Ensuite, les coordonnées des individus dans le nouvel espace sont calculées.

Mathématiquement, l'ACP consiste à calculer des combinaisons linéaires des variables de départ donnant de nouvelles composantes, appelées composantes principales qui contiennent la plus grande partie de la variabilité de la matrice de données originales [105]. L'ACP projette les données (données spectrales) dans un espace de représentation de faibles dimensions. Quand les données de départ sont des spectres tels que les spectres infrarouges, les vecteurs propres associés aux composantes principales sont équivalents à des spectres de produits purs, et les coordonnées factorielles sont analogues à des concentrations [106].

La décomposition matricielle de l'ACP permet d'obtenir des matrices des coordonnées factorielles (ou « scores ») et des contributions factorielles (ou « loadings »), selon l'Équation Error! Bookmark not defined.:

$$\text{Équation Error! Bookmark not defined. : } \mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

Avec : $\mathbf{X}(\mathbf{n}, \mathbf{p})$ est la matrice de données originale, $\mathbf{T}(\mathbf{n}, \mathbf{k})$ sont les coordonnées factorielles des individus sur les composantes principales et $\mathbf{P}^T(\mathbf{k}, \mathbf{p})$ sont les contributions factorielles des variables originales aux composantes principales.

Le calcul des composantes principales (CPs), n'est qu'une approximation de la matrice de données originales \mathbf{X} où $\mathbf{E}(\mathbf{n}, \mathbf{p})$ est la matrice des écarts entre les valeurs des données originales et cette approximation. Les coordonnées \mathbf{T} et les contributions factorielles \mathbf{P} contiennent respectivement

toute l'information importante relative aux variables et aux objets. Les écarts E portent l'information sur la dispersion résiduelle, qui n'est pas importante pour décrire le comportement des échantillons.

D'un point de vue géométrique, l'ACP peut être plus facilement comprise comme une méthode de rotation des données pour que l'observateur soit le mieux placé pour comprendre les liens relatifs entre les individus, entre les variables et entre les individus et les variables. Les coordonnées factorielles sont des représentations des individus sur des plans construits à partir des composantes principales, où l'on peut détecter des répartitions structurées des objets, la formation de groupes ou la présence d'individus aberrants.

III.2.2. Classification hiérarchique ascendante (HCA) : Analyse de regroupement

L'analyse de classification est connue sous le nom de « *Cluster Analysis* » qui est un terme générique utilisé pour désigner une variété de techniques d'analyses statistiques [107]. Ces techniques de classification sont spécialement utiles dans le cadre d'exploration des données, afin de déduire des tendances générales au sein des données et de proposer des pistes de futures analyses [108]. C'est une méthode qui divise un ensemble d'objets en classes de façon à ce que les objets similaires appartiennent à une même classe [109]. Il s'agit donc d'un outil utilisé pour la reconnaissance de forme qui détecte les similitudes entre les objets en fonction de la distance qui les sépare. La distance choisie est usuellement de type euclidien. Comme dans le cas de l'ACP, il est possible d'effectuer l'analyse sur un jeu de données transformées (prétraitées) préalablement [110].

L'analyse en clusters (la classification hiérarchique ascendante) consiste à regrouper les individus en groupes selon un critère de similitude :

$$\text{Équation Error! Bookmark not defined. : } S_{ij} = 100 \times \left(1 - \frac{d_j}{d_{max}} \right)$$

Où, d_{ij} désigne la distance entre deux points et d_{max} la distance maximale constatée séparant deux points [47]. La distance choisie est habituellement de type euclidien (Equation 16).

$$\text{Équation 14 : } d(I_i, I_j) = \sqrt{\sum_k}$$

Puisque ces méthodes hiérarchiques associent les groupes à des degrés décroissants de ressemblance, donc il est normal de représenter les résultats de la classification sous forme d'une structure arborescente que l'on appelle Dendrogramme' (Error! Unknown switch argument.).

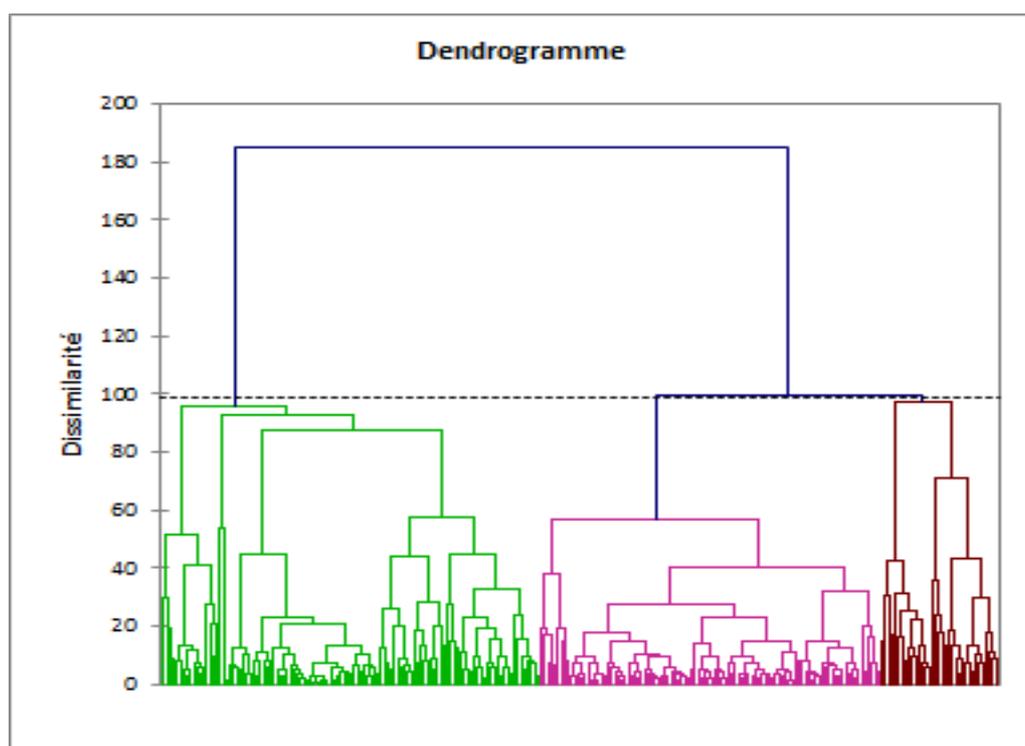


Figure 13 - Graphique d'un dendrogramme.

III.3. Méthodes prédictives (supervisées)

Les méthodes prédictives sont des méthodes statistiques qui ont pour objectif de construire, à partir de données (dans notre cas des données spectrales), **un modèle d'étalonnage**. Ce modèle multivarié permet la prédiction de grandeurs analytiques de référence à partir de données expérimentales. En pratique, nous disposons des valeurs d'absorbances spectrales pour différentes longueurs d'ondes qui seront utilisés pour prédire une variable Y en tenant compte de toute l'information cachée. L'objectif est de prédire une variable Y à partir des variables X qui sont des variables spectrales prises à différentes longueurs d'ondes.

III.3.1. Régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares : PLS)

La régression des moindres carrés partiels fait partie des méthodes supervisées, car elle se base sur une étape d'étalonnage. L'origine du développement de la régression PLS remonte aux années 80 avec *Wold H.* [111]. Depuis, d'autres auteurs ont étudié et développé cette méthode, notamment *Martens* et *Naes Tenenhaus* [112]. La méthode de régression PLS est actuellement la méthode la plus utilisée dans nombreux domaines [113].

Cette méthode de régression multivariée a pour but de modéliser la relation entre variables explicatives ($X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$; valeurs spectrales dans différentes longueurs d'onde) et une variable expliquée Y . Le but est de prédire cette variable expliquée pour des échantillons inconnus. Cette

approche, présente l'avantage, par rapport à la régression linéaire multiple classique, d'accepter plus de variables explicatives que d'échantillons. De plus, lorsqu'il y a beaucoup de variables on risque d'obtenir un modèle sur-ajusté, c'est-à-dire modélisant une partie du bruit. Correctement utilisée, la régression PLS permet d'éviter ce phénomène, car étant une régression séquentielle, on peut arrêter le processus de régression avant de modéliser l'erreur. De plus, elle permet de s'affranchir des problèmes de multicollinéarité qui gênent la régression linéaire multiple.

La régression PLS classique est un cas particulier de la méthode NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least-Squares). A chaque étape, l'information expliquée par la variable latente trouvée est soustraite à la matrice X jusqu'à ce que la variance liée à l'information soit totalement expliquée et qu'il ne reste plus que le bruit [97,114]. La différence majeure entre la régression PLS et la régression PCR (régression sur Composantes Principales) est que les composantes PLS sont optimisées pour être les plus prédictives de Y , contrairement aux composantes principales. Le modèle est le suivant :

$$\text{Équation 15: } Y_{(n,j)} = X_{(n,m)} \cdot B_{(n,j)} + E_{(n,j)}$$

Où $E_{(n,j)}$ est la matrice des écarts.

Dans notre étude, la matrice $X_{(n,m)}$ représente les spectres des échantillons et la matrice $Y_{(n,j)}$ représente les concentrations à prédire. Mais, il faut noter la différence entre le cas où il y a plusieurs variables Y à prédire et le cas où il y en a qu'une seule variable. Dans le premier cas, on parle de régression PLS multivariée (PLS2) et dans le second cas on parle de régression PLS uni variée (PLS1) [115]. Comme pour le cas de l'ACP, la régression au sens des moindres carrés partiels permet de réduire les dimensions du système par rapport à la matrice des données de départ [116].

III.3.2. Partial least square discriminante (PLS-DA)

En général, les méthodes de discrimination ont comme objectif de mettre en relation une variable qualitative indiquant l'appartenance des objets à des classes et un ensemble de variables quantitatives. Elles sont appelées aussi méthodes d'apprentissage supervisé. La méthode de régression au sens des moindres carrés partiels discriminants (PLS-DA) est une méthode de classification supervisée, qui est maintenant très utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire [117]. La connaissance a priori de l'appartenance des objets aux différentes classes est utilisée pour définir une règle d'affectation.

L'objectif principal de la méthode est de séparer des groupes d'individus d'une manière concrète. Son principe fondamental est basé sur la création de nouvelles variables Y , formées par les indicateurs des groupes et d'appliquer la régression PLS2 sur ces nouvelles variables. Considérons, un individu i appartenant à un groupe k , donc la ligne i de la variable Y est un vecteur dont tous les éléments prennent la valeur de 0, à l'exception de l'élément en position k , qui prend la valeur de 1. Les composantes discriminantes de la PLS-DA [118] peuvent être représentées sous forme de cartes

factorielles. La qualité du modèle élaboré est influencée directement par le nombre de variables latentes choisies. Ce choix du nombre de variables latentes est fait en fonction de l'erreur de prédiction du modèle d'étalonnage préétabli.

Dans un modèle établi avec un faible nombre de dimensions, il y a le risque de donner une erreur résiduelle assez élevée, mais le modèle sera fiable. Cependant, un modèle avec un très grand nombre de dimensions, sera plus précis mais introduira des informations associées à des phénomènes liés au bruit. Un pourcentage de bonne classification par rapport à la mauvaise, peut être calculé, pour évaluer la bonne prédiction de l'appartenance d'un objet à un groupe qualitatif.

III.4. Paramètres d'évaluation de la qualité des modèles

III.4.1. Modèle de calibration

Différents critères statistiques permettent d'évaluer la qualité des étapes d'étalonnage et de validation. Tout d'abord, deux paramètres permettent de vérifier les performances d'étalonnage. Il s'agit de l'erreur quadratique d'étalonnage (RMSEC) et du coefficient de détermination R^2 qui correspond au carré du coefficient de corrélation R . Le RMSEC mesure les écarts entre la valeur prédite par spectroscopie moyen infrarouge et la valeur de référence. Le RMSEC est donné par l'**Équation 16** et le coefficient de corrélation R est donné par l'**Équation 17** [119].

$$\text{Équation 16: } RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_j)^2}{n}}$$

Avec :

y_j : La concentration de référence pour l'échantillon j ,

\hat{y}_i : La concentration prédite pour l'échantillon j ,

n : Le nombre d'échantillons dans le lot d'étalonnage.

$$\text{Équation 17: } R = \frac{cov(\mathbf{y}', \mathbf{y})}{\sigma_{y'} \cdot \sigma_y}$$

Avec :

$cov(\mathbf{y}', \mathbf{y})$: La covariance de \mathbf{y}' et de \mathbf{y} ;

$\sigma_{y'} \cdot \sigma_y$: Les écarts-types respectifs de \mathbf{y}' et de \mathbf{y} .

III.4.2. Validation croisée totale

La validation croisée totale ou validation interne est basée sur la vérification à quel point le modèle se reproduira sur de nouvelles données de même nature qui ont été utilisées dans l'élaboration du modèle d'étalonnage. La validation interne d'un modèle estime l'incertitude des prévisions futures qui peuvent être faites avec le modèle. Si l'incertitude est relativement faible, le modèle peut être considéré comme validé.

Bien que l'objectif soit d'avoir suffisamment d'échantillons pour mettre une quantité raisonnable de côté comme un ensemble de test, cela n'est pas toujours possible, par exemple, pour le coût des échantillons ou des essais de référence. La meilleure alternative à un test indépendant pour la validation est d'appliquer la validation croisée.

Avec la validation croisée totale, les mêmes échantillons sont utilisés à la fois pour l'élaboration et les tests du modèle [120]. Quelques échantillons sont enlevés de l'ensemble de données d'étalonnage et le modèle d'étalonnage est élaboré à partir des données restantes. Ensuite, les valeurs pour les échantillons enlevés sont prédites et les erreurs de prédiction sont calculées. Le processus est répété avec un autre sous ensemble de l'ensemble d'étalonnage, et ainsi de suite jusqu'à ce que tous les objets soient testés, puis tous les résidus de prédiction sont combinés pour calculer les erreurs résiduelles.

Pour évaluer la qualité du modèle, l'erreur quadratique de validation croisée, notée RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation) et le coefficient de détermination R^2_{cv} sont calculés. La formule de RMSECV est donnée par l'Équation 18:

$$\text{Équation 18: } RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{icv} - y_j)^2}{n}}$$

Avec :

y_j : La concentration observée,

\hat{y}_{icv} : La concentration prédite par validation pour l'échantillon retiré,

n : est le nombre d'échantillons testés (nombre d'échantillon dans le jeu d'étalonnage)

Le coefficient de détermination R^2_{cv} qui correspond au carré du coefficient de corrélation R étant donné par l'équation (19) :

$$\text{Équation 19: } R^2_{cv} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

III.4.3. Validation externe

L'étape de validation externe permet de tester le modèle d'étalonnage [121,122] sur un groupe d'échantillons externes qui n'ont pas contribué dans l'élaboration du modèle d'étalonnage. Les valeurs de Y prédites sont ensuite comparées aux valeurs de Y observées, ce qui donne un résidu de prédiction pouvant être utilisé pour calculer une variance résiduelle de validation. Au cours de cette étape, différents indicateurs statistiques sont calculés : le coefficient de détermination de prédiction (R^2_p), l'erreur standard de prédiction RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction), l'erreur relative de prédiction en pourcentage (RE %) et la limite de détection (LOD) qui sont donnés, respectivement, par les équations (Équation 20), (Équation Error! Bookmark not defined.), (Équation 21) et (Équation Error! Bookmark not defined.).

$$\text{Équation 20: } R^2_p = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

$$\text{Équation Error! Bookmark not defined.: } RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (y_j - y'_j)^2}{n}}$$

$$\text{Équation 21: } RE \% = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i)^2}} \times 100$$

$$\text{Équation Error! Bookmark not defined.: } LOD = 3 \times RMSEP$$

III.5. Logiciels de traitement des données spectrales

De nombreux logiciels de statistiques peuvent être utilisés pour traiter des données spectrales. Ils doivent permettre de tenir compte des spécificités de ces données, en termes de volume et de leur nature. Ils doivent également fournir des outils de manipulations et de représentations graphiques des données. En effet, il existe plusieurs logiciels, parmi lesquels on peut citer : Simca-P, SPSS, Matlab et The Unscrambler.

Dans notre cas, tous les calculs ont été réalisés en utilisant les versions 10.1 et 10.2 du logiciel The Unscrambler de CAMO (Computer Aided Modeling, Trondheim, Norway). Ce logiciel possède de nombreux outils statistiques utiles à la fois pour les fonctions de prétraitement des spectres et l'étalonnage multidimensionnel.

III.6. Développement d'une méthode d'analyse

Le développement des méthodes d'analyse (quantitatives et qualitatives) est un processus qui se déroule en plusieurs étapes [123]. L'étape la plus primordiale est la collecte des échantillons

représentatifs. Les échantillons collectés doivent refléter la diversité en termes de composés à analyser. Les étapes de ce processus sont représentées dans la **Figure 14**.

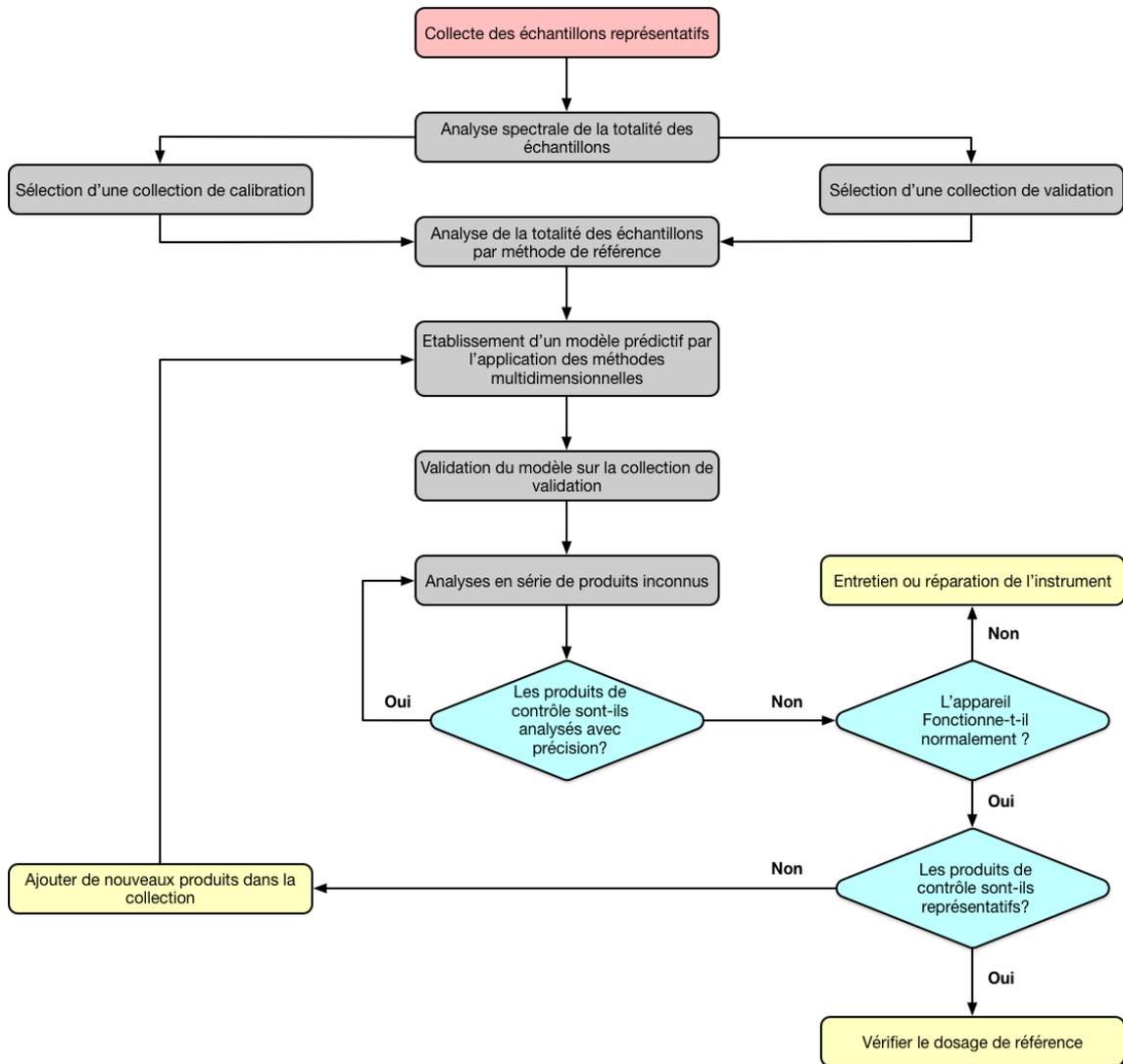


Figure 14 : Etapes de développement d'une méthode d'analyse.

Après la sélection d'une collection d'échantillons représentatifs en termes de composés à analyser, on passe à l'analyse de la totalité des échantillons par méthodes officielles et spectrales. A ce niveau, des analyses reproductibles et constantes sont nécessaires. La qualité des échantillons et des analyses conditionne la deuxième étape du développement de modèle de calibration qui fait appel aux méthodes chimiométriques. Et enfin, pour juger la fiabilité de la méthode, on applique le modèle sur une série d'échantillons connus qui n'ont pas fait partie des échantillons de calibration.

Une fois le modèle établi est jugé satisfaisant, la méthode développée peut servir pour prédire les teneurs des échantillons dont les valeurs de références sont inconnues.

IV. Les applications de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques

Suite aux développements des appareils basés sur la transformé de Fourier et des nouveaux dispositifs de présentation des échantillons, les applications du moyen infrarouge en agroalimentaire se sont développés récemment [124], elles concernent les aspects qualitatifs et quantitatifs. Etant donné que l'adultération peut avoir de graves conséquences sur la santé humaine, cette méthode est largement utilisée pour l'authentification et la recherche de fraudes. Ce développement est une réponse à l'intérêt croissant des consommateurs pour les questions de qualité et de sécurité des aliments, ce qui a contribué à la demande croissante de technologies analytiques sensibles et rapides.

Cette méthode est appliquée dans divers domaines à savoir : la détection et la quantification de l'addition frauduleuse d'adultérant au café torréfié et moulu, la détection et la quantification de l'adultération de l'huile d'avocat avec différentes huiles comestibles et la discrimination rapide du porc dans les saucisses au jambon halal et non halal [125]. Dans le domaine pharmaceutique, cette méthode peut être utilisée qualitativement pour détecter, identifier et qualifier les matières premières et contrôler les produits finis [126].

Dans le domaine du lait et des produits laitiers, la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques peut être considérée comme un outil de grande utilité dans ce domaine. En outre, l'authenticité des produits laitiers est devenue une question urgente pour les producteurs, les chercheurs, les gouvernements et les consommateurs.

En amont de la chaîne, *Valenti et al.* [127] ont évalué l'utilisation potentielle de la spectroscopie NIR pour différencier les échantillons de lait selon le système d'alimentation, la race et l'altitude de la ferme. Par l'application de PLS-DA aux ensembles de données spectrales, cette étude a permis de distinguer trois principaux systèmes d'alimentation définis par le fourrage dominant : ensilage de maïs, pâturage et foin. En se basant sur l'absorbance caractéristique des protéines du lait, dans une autre étude l'utilisation de la spectroscopie de réflectance totale atténuée dans le moyen infrarouge a permis de déterminer la concentration de protéines dans le lait cru [128]. Cette technique a pu, grâce à l'application de la PLS dans la spectroscopie moyen infrarouge, être considérée comme une bonne méthode, rapide et peu coûteuse pour évaluer le profil des acides gras du lait [129].

D'autres études se sont intéressées à l'authentification du lait et des produits laitiers. Comme pour le cas de la détection et la quantification de la mélamine dans le lait (liquide et poudre) grâce à l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) à réflectance totale atténuée à un seul rebond (SB-ATR) [130]. En appliquant une série d'outils chimiométriques, des auteurs ont réussi à détecter la présence de mélamine même à un niveau inférieur à 1 ppm [131], [14], [132]. Les résultats de ces travaux montrent que le couplage de la spectroscopie infrarouge aux méthodes chimiométriques constitue un outil efficace pour la détection de la mélamine dans les produits laitiers.

Dans le domaine des huiles, l'application de la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques a pu démontrer son intérêt dans divers travaux. *A. Oussama et al.* [133] ont pu classer et quantifier l'adultération d'huile d'Argan avec des huiles de tournesol ou de soja. Une autre étude a pu démontrer que la détection et la quantification de l'adultération d'huile d'olive extra-vierge avec différentes huiles comestibles, est possible en utilisant la spectroscopie infrarouge moyenne (IR) avec la chimiométrie. Dans cette étude, les données ont été analysées par l'ACP et PLS-DA pour détecter l'adultération quel que soit le type d'huile adultérante [134]. Les mêmes techniques ont été utilisées pour la classification des huiles d'olives selon les origines géographiques [135]. De même pour la classification des huiles d'olives selon les variétés [136].

Les résultats de ces travaux montrent que la spectroscopie infrarouge combinée aux méthodes chimiométriques, peut être utilisée comme une méthode d'analyse rapide, sensible, robuste et à faible coût.

C'est dans ce sens, que notre étude s'oriente, elle vise à développer d'autres applications de la spectroscopie infrarouge combinée à la chimiométrie pour l'authentification et le contrôle qualité du lait.

V. Conclusion

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) associée à des techniques statistiques multivariées (chimiométrie) permet d'obtenir des informations spécifiques sur différents paramètres simultanément d'une manière directe, fiable et rapide. Les méthodes chimiométriques sont appliquées pour réduire la dimensionnalité des données collectées et pour extraire des informations quantitatives et qualitatives à partir des spectres complexes.

Les procédures spectroscopiques IR-TF peuvent être réalisées dans un temps très court. Les spectres peuvent ainsi être traités pour réduire le rapport signal sur bruit, ce qui améliore encore le contenu d'information spectrale.

Contrairement aux techniques d'analyse qui prennent beaucoup de temps, Les techniques chimiométriques nécessitent un faible volume d'échantillon et elles sont respectueuses de l'environnement, du fait qu'une préparation minimale ou nulle de l'échantillon est nécessaire, ce qui accélère considérablement l'analyse de l'échantillon.

Les avantages de cette méthode ont permis sa large utilisation en agroalimentaire, que ce soit pour les analyses qualitatives, quantitatives ou pour les l'authentification des composés et des produits agroalimentaires.

Chapitre 3 : la détection de l'adulteration du lait de chamelle par le lait de vache en utilisant la spectroscopie FT-IR couplée à des méthodes chimiométriques.

I. Introduction

L'adulteration alimentaire a été pratiquée depuis des temps anciens, mais elle est devenue plus avancée ces dernières années. Elle est considérée comme un risque pour la santé publique et concerne toute opération touchant les ingrédients alimentaires. Elle consiste en l'addition d'une substance non authentique pour masquer un ingrédient de qualité inférieure, par le remplacement complet ou partiel d'un ingrédient alimentaire ou d'un constituant authentique par un substitut moins coûteux, ou l'élimination d'un constituant authentique et précieux et tout ceci est fait sans aucune information pour le consommateur [137].

En outre, ce terme est défini comme un terme collectif utilisé pour englober la substitution délibérée et intentionnelle, l'addition, l'altération ou la mauvaise représentation d'aliments, d'ingrédients alimentaires ou d'emballages alimentaires; ou des déclarations fausses ou trompeuses faites à propos d'un produit, pour un gain économique [140].

Les produits laitiers sont très diversifiés et connaissent ce type de pratiques. Ils peuvent être falsifiés par addition d'ingrédients non alimentaires pour améliorer le rapport des constituants, comme dans le cas de l'addition de la mélamine pour améliorer la teneur en protéine [138], et l'addition de saccharose couplée à l'addition d'eau. L'adulteration peut également être réalisée par l'ajout d'un agent conservateur (le formaldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, le chlorure de sodium ou le chlore), cette pratique est justifiée par la rupture de la chaîne du froid [139]. Dans d'autres cas, l'adulteration peut être faite par l'addition d'ingrédients non laitiers, comme l'addition de la margarine dans le beurre laitier [13].

Cependant, le cas étudié dans ce travail est l'authenticité des produits laitiers. Cette pratique n'est pas moins dangereuse que les précédentes. La fraude alimentaire touchant l'authenticité a un impact sur les valeurs nutritionnelles des produits, surtout quand les enfants ou les personnes les plus âgées sont les consommateurs finaux de ces produits.

En général, la détection de la falsification des produits laitiers peut se faire de différentes manières.

- La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem qui est utilisée pour détecter l'adulteration du contenu des protéines. Cette

méthode offre une approche rapide et efficace pour lutter de manière proactive contre l'adulteration économique des produits contenant des protéines [140].

- La spectroscopie vibratoire [141] et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [130] sont utilisées pour détecter l'addition de la mélamine dans le lait.
- L'immunochromatographie est également utilisée pour détecter l'ajout de la poudre de lactosérum dans le lait liquide et le lait en poudre, cette pratique est très répandue dans l'industrie du lait [142]. La chromatographie liquide à haute performance est utilisée pour détecter l'addition frauduleuse de lait bovin dans le fromage Mozzarella de buffle [143].

Les méthodes basées sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) sont utilisées pour l'évaluation de l'authenticité des produits laitiers, cette méthode analytique est utile pour la détection des espèces laitières, en particulier lorsque des produits laitiers sont commercialisés avec le label d'origine [144]. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est utilisée pour détecter l'origine géographique d'un produit laitier [145], en effet, les Produits ayant une étiquette AOP (appellation d'origine protégée) connaissent un autre type de fraude qui touche l'authenticité de ces produits. La spectroscopie FT-MIR couplée aux méthodes chimiométriques constitue une alternative potentielle dans la prévention de la fraude et la détermination de la qualité et / ou de l'authenticité des produits laitiers, c'est une méthode non destructive qui peut être réalisée rapidement et à moindre coût et avec des conditions minimales pour la préparation des échantillons [146]. Cette méthode est basée sur la spécificité des spectres infrarouges pour l'identification des constituants des produits, en effet le spectre donne une "empreinte digitale" spécifique pour les produits analysés. Les spectres donnés constituent des données chimiques, qui peuvent être mathématiquement modélisés par les statistiques multivariées. La capacité de la spectroscopie FT-MIR, pour la détection de l'addition de la mélamine, a été étudiée en utilisant différentes méthodes de chimiométrie et même pour de faibles concentrations [77]. Les méthodes chimiométriques ont permis d'extraire les informations contenues dans la gamme de longueurs d'onde de 3100 à 910 cm^{-1} et de donner la possibilité de détecter l'adultération du lait de vache par l'addition du saccharose [147].

Comme tous les produits laitiers, le lait de chamelle constitue une source très importante de protéines, en particulier en Asie et en Afrique et il est connu par ses bienfaits pour la santé [148]. Le nombre de têtes de chameaux dans le monde est estimé à 27 millions, partagé par l'Afrique avec 82,4% et l'Asie avec 17,5%, produisant environ 2,78 millions de tonnes de lait dont 91,2% en Afrique et 17,8% en Asie.

Au Maroc, le nombre de têtes de chameaux est d'environ 57 mille têtes et la production du lait de chamelle est estimée à 6,16 mille tonnes produite principalement dans les régions du sud du pays [22].

L'adultération de ce type de lait est motivée économiquement par la grande différence de prix entre le lait de chamelle et le lait des autres espèces. A titre de comparaison le lait de chamelle est trois fois plus cher que celui de la vache.

L'adultération peut être faite par l'ajout de lait de vache ou de chèvre. La limite de cette fraude est la capacité des consommateurs à détecter le changement de l'odeur et le goût dans ce lait ayant un goût très prononcé, une aptitude qui reste très peu accessible au consommateur moyen non averti.

Néanmoins, pour protéger l'ensemble des consommateurs de ces pratiques, le contrôleur alimentaire doit disposer d'outils rapides pour décider facilement de son authenticité, notamment lorsque sa consommation est justifiée par ces bienfaits pour la santé ce qui le rend très convoité et face à une faible production nationale son adultération s'avère être un moyen de gain rapide mais illicite. D'où la nécessité de développer et déployer des moyens et méthodes d'authentification efficaces et rapide, et c'est dans ce sens que s'inscrit ce travail, dont, l'objectif est d'étudier le potentiel de l'application de la spectroscopie MIR-TF couplée aux méthodes chimiométriques pour détecter l'authenticité du lait de chamelle et son adultération par le lait de vache.

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage

Dans ce travail, les échantillons de lait cru ont été étudiés quantitativement. Ils ont tous été prélevés dans la région de Laayoune Boujdour Sakia L'Hamra (Maroc). Par ailleurs, les concentrations de lait de vache ajoutées variaient entre 1 et 40% (p/p'). Un total de 48 échantillons a été préparé pour analyse, dont 40 ont servi pour l'étalonnage. Pour la validation externe du modèle 8 échantillons ont été choisis de manière à couvrir la gamme d'étalonnage.

Tous les échantillons ont été analysés 3 fois pour évaluer la reproductibilité du modèle.

II.2. Analyse en moyen infrarouge (MIR)

Les spectres FT-MIR ont été obtenus en utilisant un Spectrophotomètre FTIR Bruker Vector 22 équipé d'une réflectance totale atténuée (ATR) (Pike Miracle, Pike Technologies, Madison, Etats-Unis) et avec un détecteur DTGS, une source Globar et un séparateur KBr, avec une résolution de 4 cm^{-1} . En moyenne 98 scans par spectre ont été enregistrés, en mode absorbance dans le domaine 3100-920 cm^{-1} . Les mesures ont été effectuées à température ambiante et un spectre de référence a été recueilli avant toutes les mesures des échantillons.

Le lait de vache ajouté au lait de chamelle a été déterminé par la méthode volumétrique. Chaque échantillon de lait, avec une concentration connue de lait de vache ajouté, a été analysé pour obtenir les spectres FT-MIR.

La concentration de lait de vache ajoutée et les spectres FT-MIR correspondants ont été utilisés pour les calculs.

II.3. Méthodes chimiométriques

Avant le développement de tout modèle d'étalonnage, les spectres des échantillons subissent un prétraitement pour améliorer la pertinence du modèle. Les techniques de prétraitement les plus utilisées peuvent être divisées en deux catégories :

- Les méthodes de correction de dispersion qui comprennent la Déviation Normale Standardisée (Standard Normal Variate : SNV), la normalisation, le centrage par la moyenne.
- Les dérivées spectrales. représentées par les dérivées de Norris-Williams (NW) et la dérivée polynomiale de Savitzky-Golay (SG) [149].

II.3.1. Régression des moindres carrés partiels (PLS)

Dans ce travail, la méthode de régression PLS [150] a été utilisée pour développer un modèle d'étalonnage. La PLS consiste à maximiser la covariance entre blocs de données \mathbf{X} et \mathbf{Y} . Et puisque les données spectrales IR-TF (matrice de données \mathbf{X}) contiennent les informations quantitatives pertinentes ; un modèle d'étalonnage adéquat peut être utilisé pour extraire ces informations et pour prédire le pourcentage de l' variable de réponse \mathbf{y} (le lait de vache ajouté au lait de chamelle).

Dans cette étude, les spectres MIR collectés ont été utilisés comme matrice \mathbf{X} et les différentes concentrations de lait de vache ajoutés aux échantillons ont été utilisées comme vecteur \mathbf{y} .

Le choix du nombre optimal de variables latentes dans le PLS a été effectué en utilisant :

- L'erreur de prédiction la plus faible dans la validation croisée totale (en laissant un échantillon à la fois).
- La prédiction optimale des valeurs \mathbf{y} pour les échantillons de validation externes (non inclus dans l'étape d'étalonnage).

II.3.2. Paramètres statistiques

L'évaluation de la qualité des résultats obtenus a été discutée en comparant différentes paramètres comme le coefficient de détermination (R^2), Erreur quadratique moyenne de calibration ou de prédiction (RMSEC et RMSEP) et la limite de détection (LOD) [151]. Dans ce travail, le calcul des erreurs de prédiction relative en pourcentage (ER%) des concentrations a également été donné, à la fois pour les étapes d'étalonnage et de prédiction.

L'évaluation de la qualité des résultats obtenus est discutée en comparant les valeurs prédites et les valeurs expérimentales, tant pour l'étalonnage que pour les ensembles de données de validation.

II.3.3. Logiciels

Tous les spectres moyen infrarouge acquis ont été élaborés par le logiciel Unscrambler (version 10.2, CAMO, Norvège) pour l'application de la PLS.

III. Résultats et discussion

III.1. Spectres IR-TF du lait de chamelle et de vache

La **Figure 15** montre les spectres d'absorption MIR-TF du lait de chamelle et du lait de vache purs dans la plage spectrale de 3600 à 920 cm^{-1} . Les spectres montrent plusieurs pics correspondant aux interactions des liaisons moléculaires du lait avec les radiations MIR-TF avec l'étirement de la liaison O-H d'eau absorbant à 3650-3000 cm^{-1} .

D'autres pics ont été observés pour l'amide I, l'amide II et l'amide III à 1650, 1550 et 1240 cm^{-1} respectivement. Le pic à 1040 cm^{-1} correspond à l'énergie absorbée du lactose due au groupe hydroxyle (O-H) et à l'atome de carbone. Les lipides absorbants à 1745 (graisse A), 2874 cm^{-1} (graisse B), 1464 cm^{-1} (graisse ') et 1175 cm^{-1} , correspondent respectivement à l'étirement C=O (carbonyle), l'étirement CH (alkyl), la flexion CH et les vibrations d'étirement CO [152].

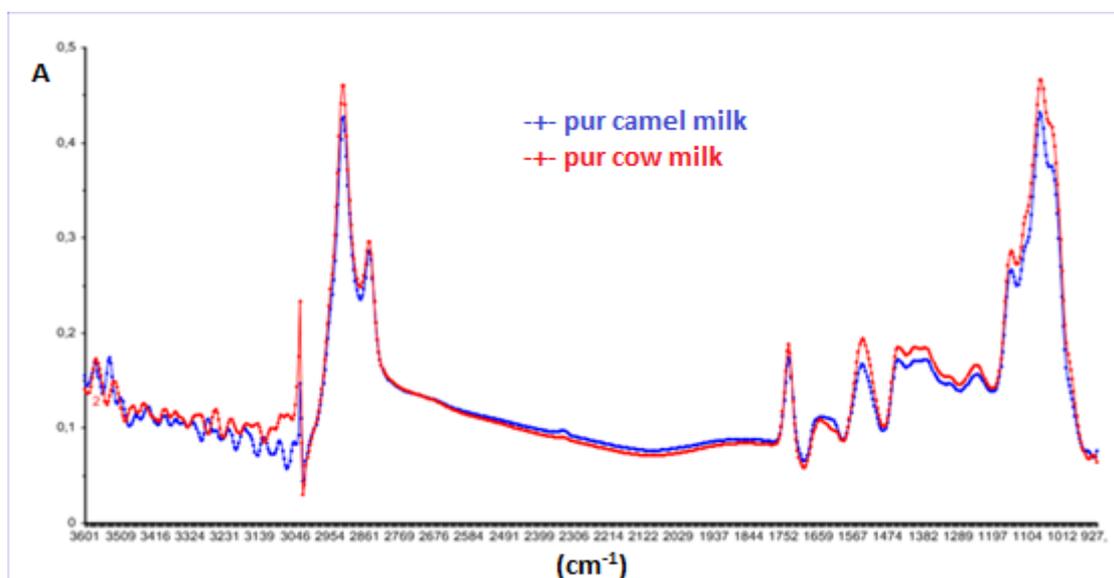


Figure 15- Les spectres d'absorption MIR du lait de chamelle pur (bleu) et du lait de vache pur (rouge) dans la gamme spectrale d' 3600-920 cm^{-1}

La bande à 1100 cm^{-1} est généralement associée au groupe phosphate (O=P-O) des protéines des caséines [78]. A partir de la **Figure 15**, on note une différence entre les spectres du lait de chamelle pur (bleu) et de la vache mil (rouge).

Avant d'appliquer des méthodes chimiométriques à l'ensemble de données, une sélection des régions de longueur d'onde à utiliser dans l'étalonnage a été effectuée de manière à assurer une acquisition des informations les plus utiles et un retrait de zones redondantes ou de données bruyantes. La région comprise entre 3600 et 3000 cm^{-1} a été éliminée du fait qu'elle contenait surtout des bandes d'absorption d'eau, fournissant des informations inutiles ou bruyantes'. Le spectre entre 3000-920 cm^{-1} a été considéré comme une région d'empreinte digitale.

III.2. Analyses en composantes principales (ACP)

Dans cette étude, l'ACP a été utilisée comme un outil exploratoire pour étudier les principales tendances dans l'ensemble d's spectres collectés et pour déterminer la possibilité de discrimination entre les échantillons de lait de chamelle fraudées avec le lait de vache.

L'ACP avec validation croisée totale a été appliquée à l'ensemble de données des échantillons d'étalonnage en explorant la plage spectrale de 3000 à 920 cm^{-1} .

En raison de la complexité et du nombre élevé de signaux spectroscopiques, certains prétraitements de données ont été testés, dans le but d'éliminer ou au moins de réduire les informations redondantes ou inutiles.

La Figure 16 représente graphiquement le score PC1 par rapport au score PC2. Dans ce cas l'ACP est appliqué sans prétraitements mathématiques. Dans cette figure on arrive à distinguer 4 groupes avec des concentrations ascendantes en termes de concentration de lait de vache ajoutée. Le modèle PCA sans prétraitement et avec cinq PC arrive à expliquer plus de 95% de la variance totale des données (PC1, PC2, PC3, PC4 et PC5 ont capturé respectivement 64%, 25%, 3%, 2% et 2% de la variance).

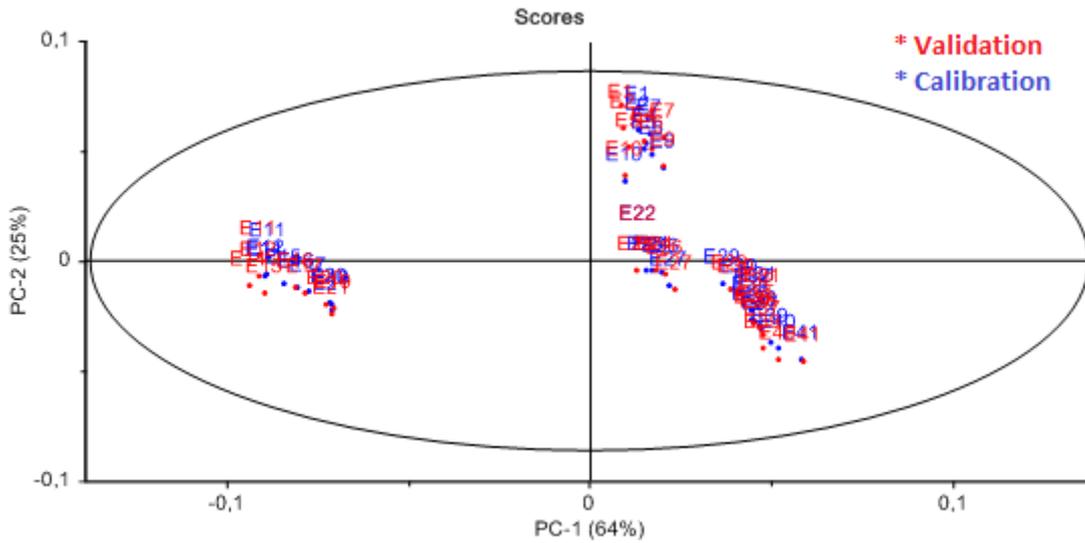


Figure 16- ACP sans prétraitement

Les mêmes groupes d'échantillons sont différenciés lors de l'application du centrage par moyenne (Meancentring : MC) (**Figure 17**). Le modèle ACP-MC avec cinq PC arrive à expliquer plus de 95% de la variance totale des données (PC1, PC2, PC3, PC4 et PC5 ont capturé respectivement 64%, 25%, 3%, 2% et 2% de la variance). Dans le cas du centrage par moyenne la variance totale est expliquée avec les mêmes pourcentages de l'ACP sans prétraitements.

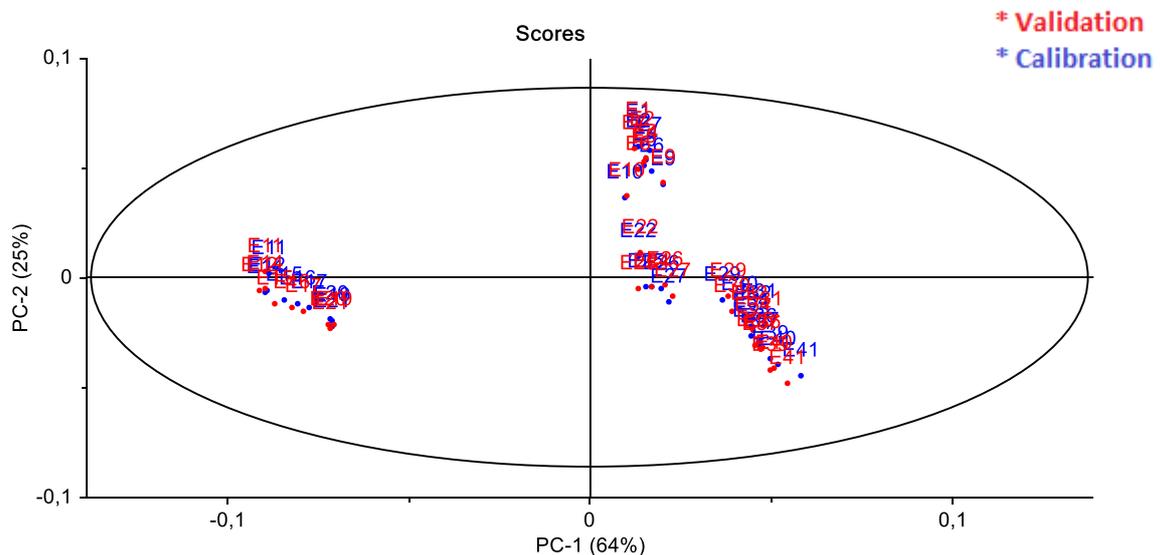


Figure 17- ACP avec centrage par moyenne

L'ACP avec l'application du prétraitement à l'aide de la Déviation Normale Standardisée (SNV) arrive à distinguer les 4 groupes précédents (**Figure 18**), mais la variance totale est expliquée avec des pourcentages plus faibles que les méthodes précédentes. Le modèle ACP-SNV avec cinq PC arrive à

expliquer 93% de la variance totale des données (PC1, PC2, PC3, PC4 et PC5 ont capturé respectivement 75%, 9%, 4%, 3% et 2% de la variance).

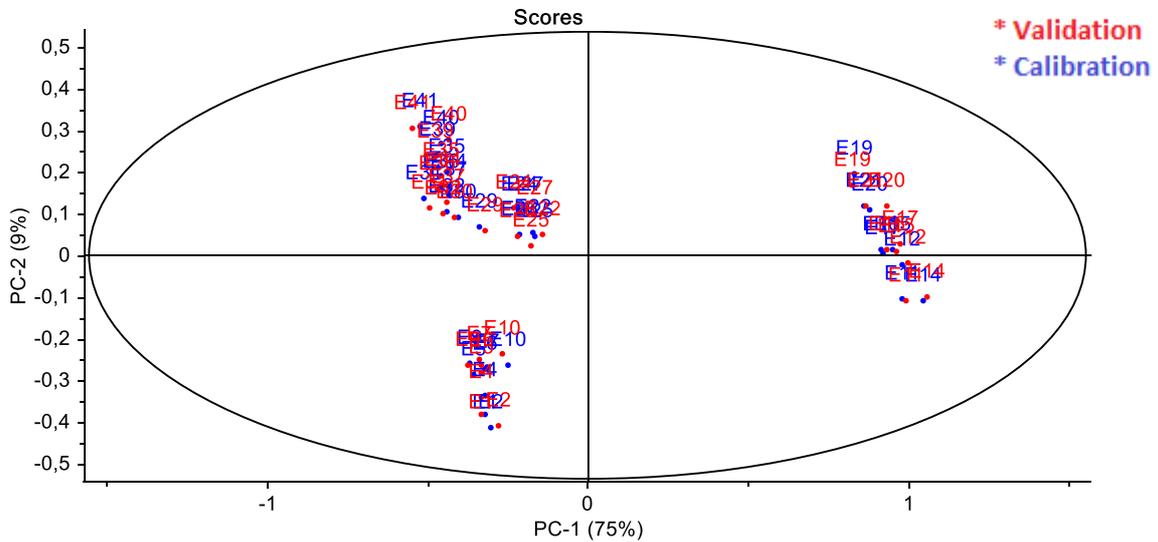


Figure 18- ACP avec Déviation Normale Standardisée (SNV)

Par contre, lors de l'application des autres prétraitements (Gap Segment, Norris Gap et 1^{ère} dérivée de Savitzky-Golay) l'ACP n'arrive pas à effectuer une discrimination claire entre les échantillons de lait de chamelle fraudés et ceux de lait de vache (Figure 19, Figure 20 et Figure 21).

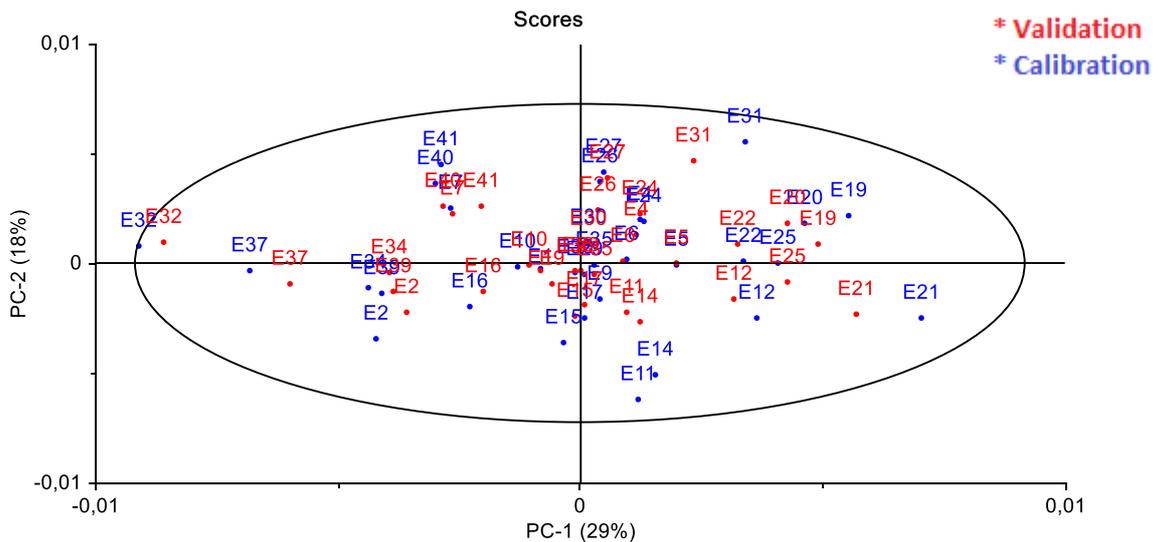


Figure 19- ACP avec Gap Segment

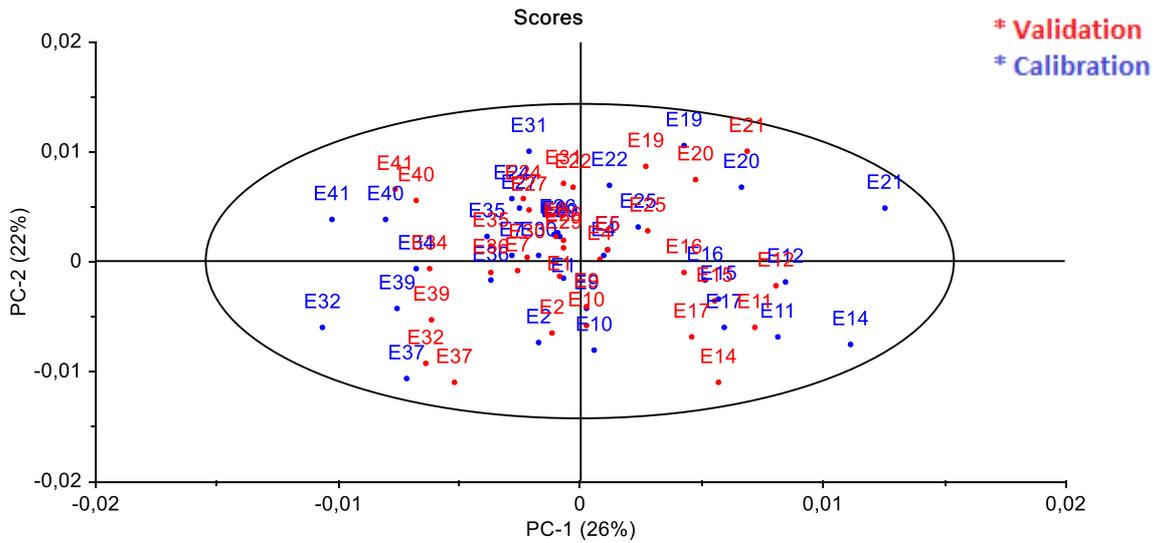


Figure 20- ACP avec Savitsky-Golay

Lors de l'application de ces prétraitements l'ACP avec cinq PC n'arrive à expliquer que moins de 80% de la variance totale. Gap Segment 80%, 1^{ère} dérivée de Savitzky-Golay 78% et Norris Gap 77%.

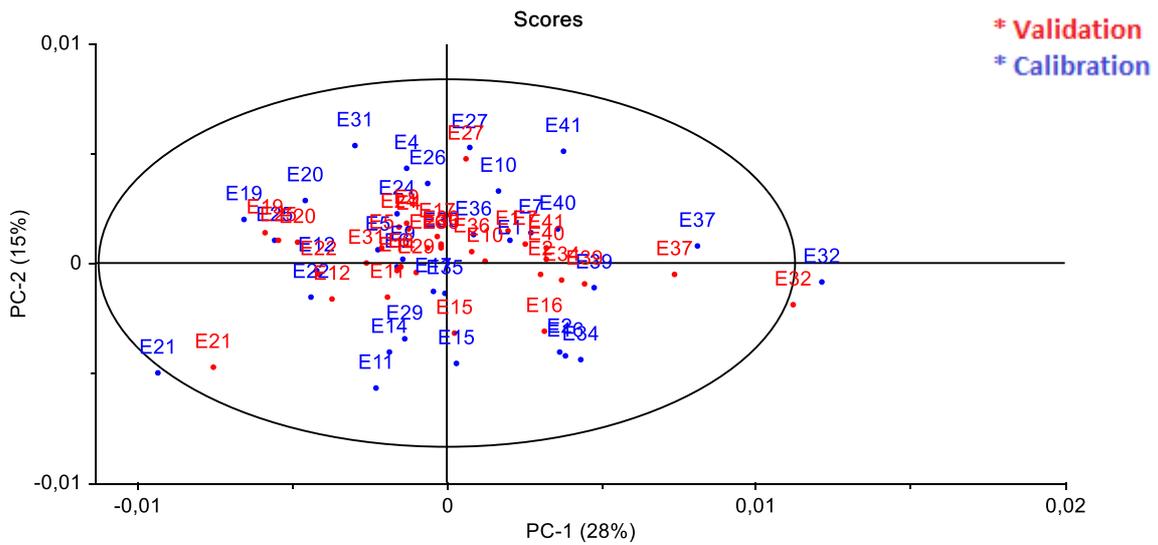


Figure 21- ACP avec Norris Gap

Sur La représentation graphique du score PC1 par rapport au score PC2 pour l'ACP sans prétraitement on distingue clairement quatre grands groupes d'échantillons (Figure 22).

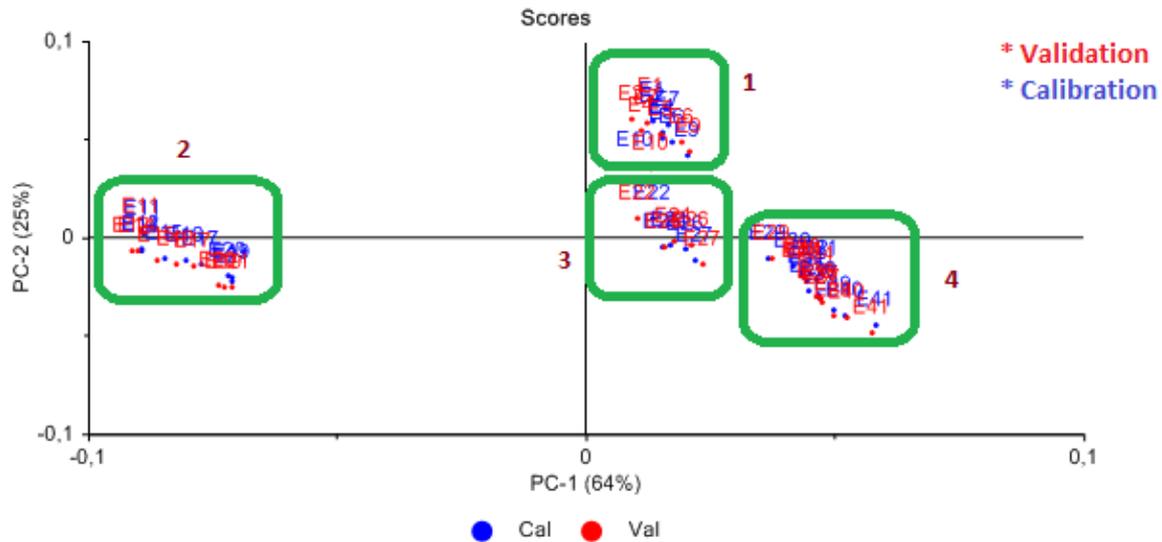


Figure 22- Analyse en composante principale des spectres MIR-TF des échantillons de lait de chamelle fraudé avec le lait de vache.

La différence entre les échantillons de lait de chamelle correspond à la gamme de pourcentage de lait de vache ajoutée au lait de chamelle. Ainsi quatre groupes ont été définis en se basant sur le pourcentage de lait de vache ajouté.

- Groupe 1 : constitué des échantillons de lait de chamelle contenant la gamme de pourcentage de 0 à 9% de lait de vache.
- Groupe 2 : constitué des échantillons de lait de chamelle contenant la gamme de pourcentage de 10 à 20 % de lait de vaches.
- Groupe 3 : constitué des échantillons de lait de chamelle contenant la gamme de pourcentage de 21 à 26% de lait e vache.
- Groupe 4 : constitué des échantillons de lait de chamelle contenant la gamme de pourcentage de 27 à 40% de lait e vache.

L'explication des paramètres de discrimination entre les groupes est réalisée avec le graphique de chargement du premier PC (**Figure 23**). Ce graphique montre que les bandes d'absorption les plus importantes sont à 3000, 1550 et 1100 et 1040 cm^{-1} . Ces bandes étaient associées à 'es bandes liées à la matière grasse et aux protéines et au lactose. Les différences enregistrées dans les spectres des différents échantillons de lait de chamelle devraient être attribuées à différents pourcentages de matières grasses, de protéines et de lactose affectés par l'addiction du lait de vache.

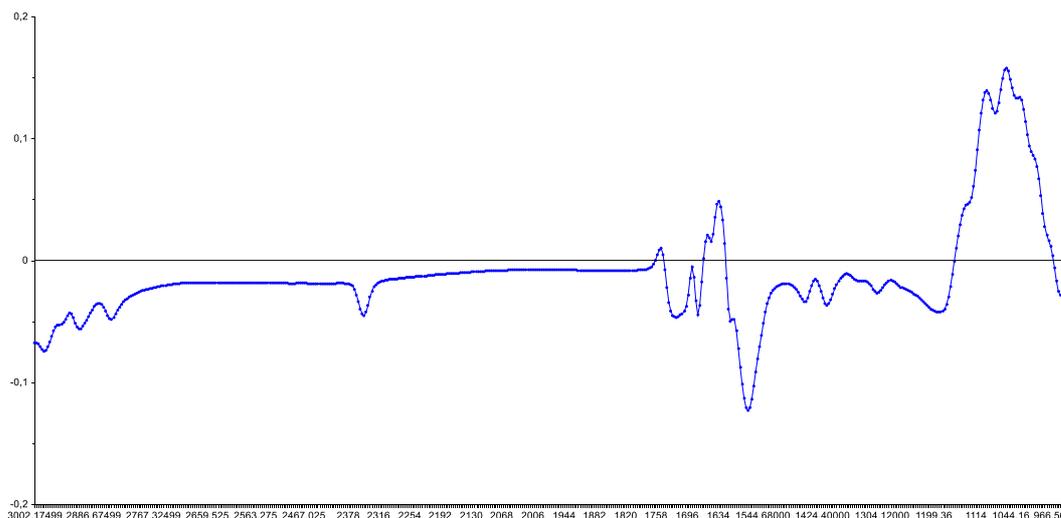


Figure 23- Graphique du chargement de la première PC du modèle ACP sans prétraitement du spectre dans la plage allant de 3000 à 920 cm^{-1} .

III.3. Elaboration du modèle de calibration

Les résultats ont été vérifiés avec des paramètres statistiques et quantifiés par le modèle d'étalonnage PLS pour obtenir la meilleure équation de régression.

Les caractéristiques spectrales MIR-TF de différents rapports de lait de vache ajouté à différentes concentrations ont été étudiées. La région 3000-920 cm^{-1} des spectres a été utilisée pour construire la calibration PLS.

La régression PLS a montré un bon ajustement entre les niveaux de référence et les valeurs prédites MIR pour l'adultération du lait de chamelle (**Figure**).

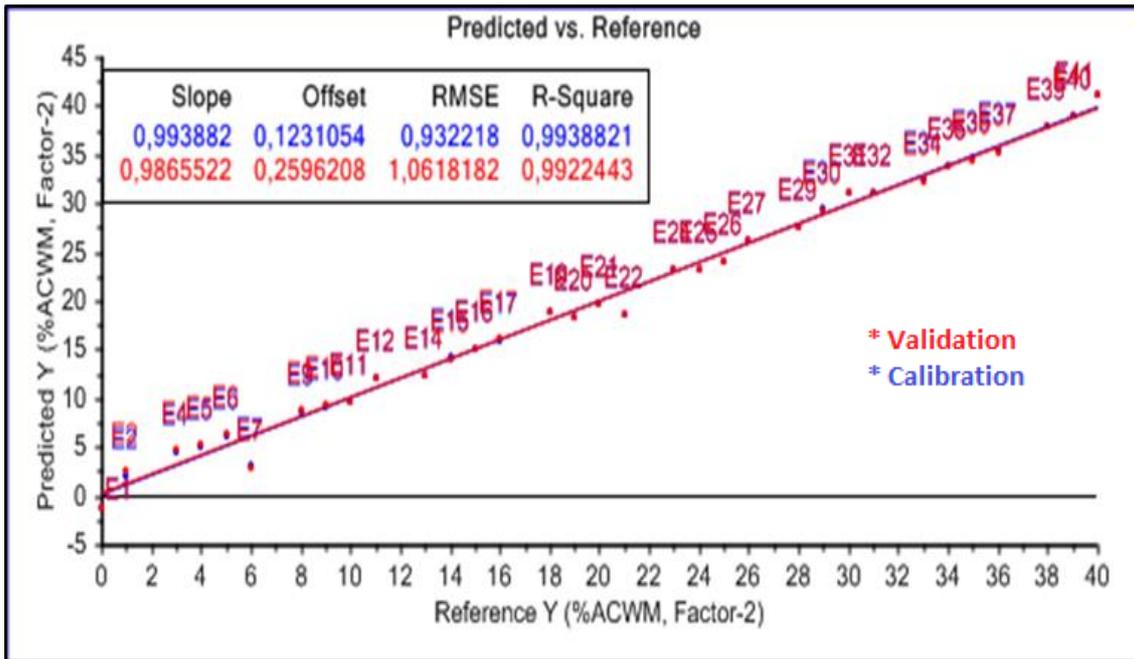


Figure -Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée sur de données spectrales dans la zone de 3'00-920 cm^{-1} .

La **Figure** représente les paramètres du modèle de PLS, sans l'application de prétraitement mathématiques des données spectrales, et elle présente les valeurs mesurées par rapport à la prévision de la concentration de lait de vache ajoutée. Les échantillons d'étalonnage sont représentés en bleu et les échantillons de validation croisée en rouge. Il convient de souligner que les deux parcelles d'étalonnage sont très similaires, avec tous les échantillons (pour l'étalonnage et la validation croisée) le long de la ligne d'étalonnage.

La même remarque est faite lorsqu'on applique la PLS avec le centrage par moyenne, illustre par la **Figure 24** qui représente les paramètres du model PLS avec l'application du prétraitement avec centrage par moyenne. En revanche l'application des autres prétraitements mathématiques diminue les performances du modèle PLS.

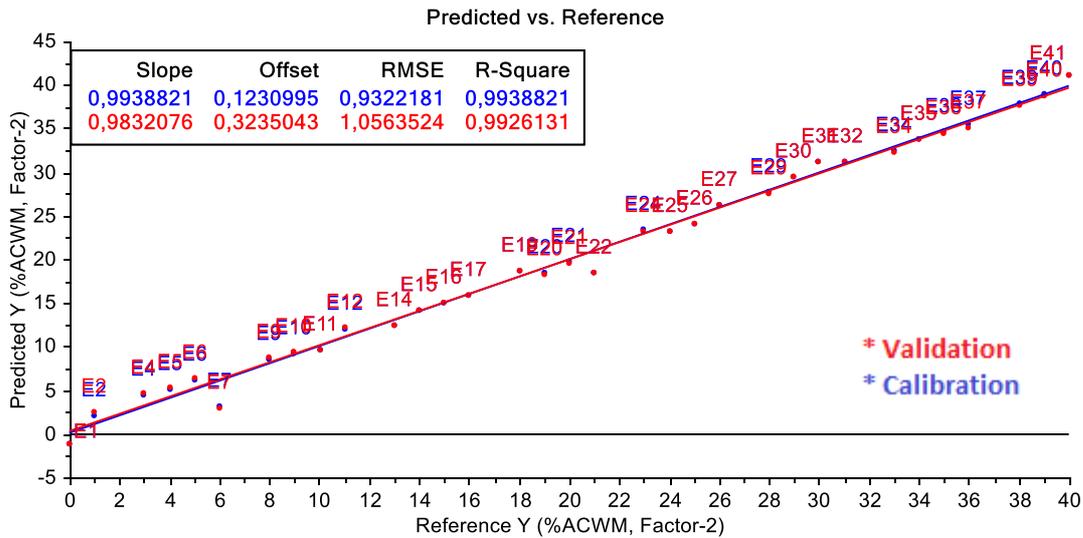


Figure 24- Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec l' centrage par moyenne sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1} .

Les figures **Figure 25**, **Figure 26**, **Figure 27** et **Figure 28** présentent les modèles de la PLS élaborés avec les autres prétraitements (Standard Normal Variate, Gap Segment, Norris Gap et 1^{ère} dérivée de Savitzky-Golay). La **Figure 25** présente les résultats du modèle PLS après prétraitement des spectres avec la SNV ; les performances de ce modèle sont proches des performances du modèle PLS sans prétraitements ou avec le centrage par moyenne. En revanche, Les autres prétraitements diminuent les performances du modèle PLS.

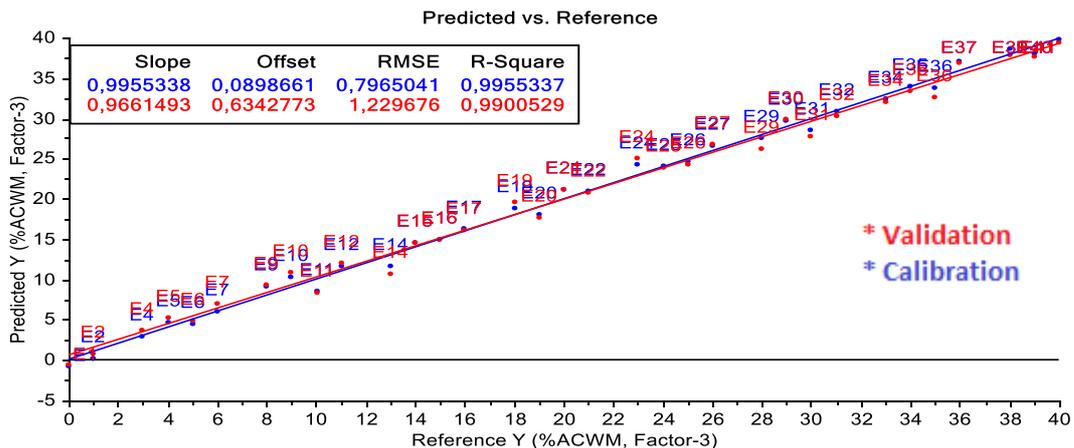


Figure 25- Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec l' SNV sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm^{-1} .

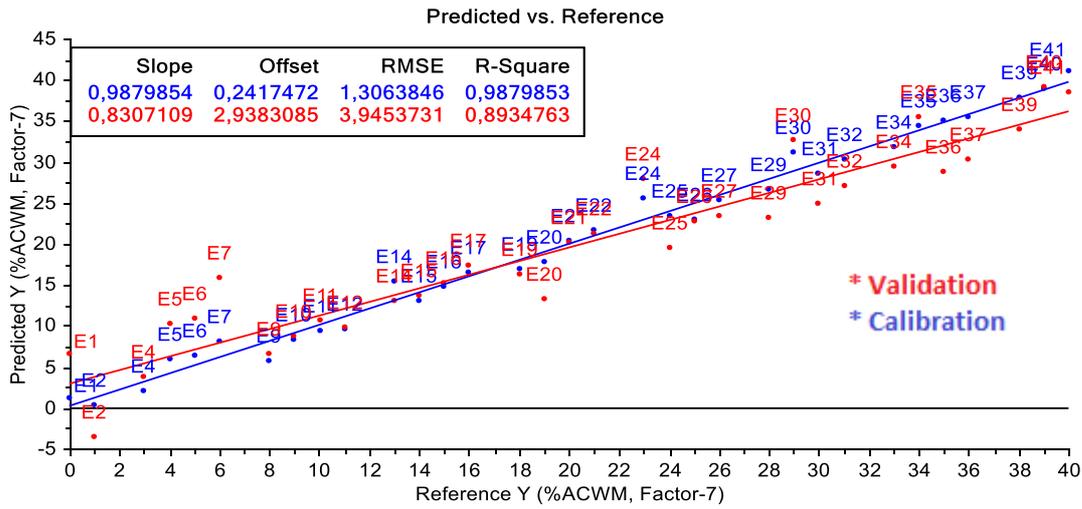


Figure 26- Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec l' dérivée Noris Gap sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm⁻¹.

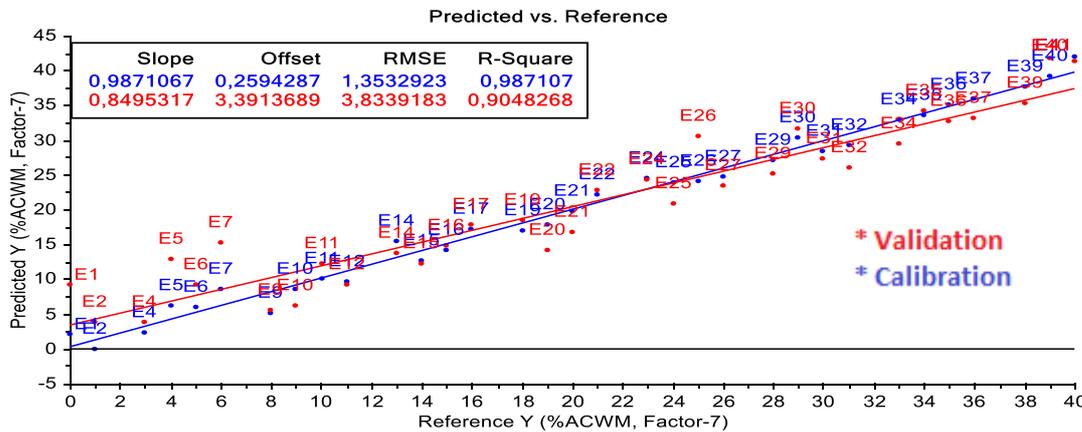


Figure 27- Les valeurs de référence versus les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque la PLS a été appliquée avec l' dérivée Gap Segment sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm⁻¹.

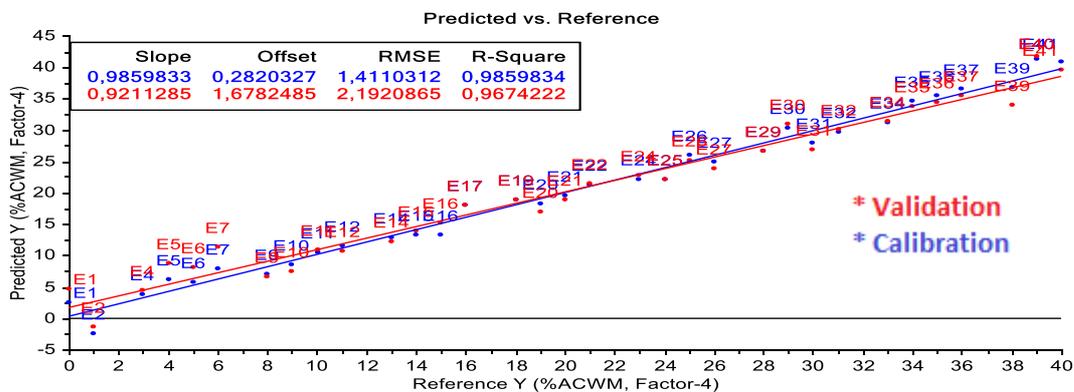


Figure 28- Les valeurs de référence vs les valeurs prédites du lait de vache ajoutée (ACWM) au lait de chamelle dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée lorsque

la PLS a été appliquée avec l' dérivée de Savitzky-Golay sur des données spectrales dans la zone de 3000-920 cm⁻¹.

Le **Tableau 10** montre les résultats de la régression PLS sans prétraitement et avec différents modes de prétraitement. Les résultats montrent que l'utilisation de la régression PLS sans prétraitement ou avec centrage par moyenne donne les résultats le plus élevés.

Sans prétraitement ou avec centrage par moyenne, le modèle développé a montré le plus grand R-Square avec une puissance prédictive élevée. Dans la validation croisée totale des modèles élaborés, les effets des prétraitements mathématiques sur le R-Square varient de 0% à -9.9%.

De toute façon, le seul moyen d'estimer le véritable pouvoir prédictif d'un modèle est de le tester sur une collection d'échantillons (validation externe).

Tableau 10- Les paramètres de l'étalonnage et de la prédiction à l'aide de la régression PLS sans prétraitements et avec différentes méthodes de prétraitement.

Data Prétraitement	Calibration				Cross Validation			
	Slope	Offset	RMSEC	R-Square	Slope	Offset	RMSECV	R-Square
No Prétraitement	0.9939	0.1231	0.9322	0.9939	0.9866	0.2596	1.0618	0.9922
Meancentring	0,9938	0,1230	0,9322	0,9939	0,9832	0,3235	1,0563	0,9926
Standard Normal Variate	0.9955	0.0899	0.7965	0.9955	0.9661	0.6343	1.2297	0.9901
Savitzky-Gloay Derivatives	0.9860	0.2820	1.4110	0.9860	0.9211	1.6782	2.1921	0.9674
Gap Segment Derivatives	0.9871	0.2594	1.3533	0.9871	0.8495	3.3914	3.8339	0.9048
Norris Gap Derivatives	0.9880	0.2417	1.3064	0.9880	0.8307	2.9383	3.9454	0.8935

RMSEC : Erreur quadratique de calibration ; RMSECV : Erreur quadratique de la validation croisée ; R-Square : coefficient de détermination.

III.4. Validation externe

Les six modèles obtenus ont été vérifiés par la validation externe avec différentes gammes de concentration de lait de vache ajouté dans le lait de chamelle.

La **Figure 29** représente les résultats de la validation externe du modèle PLS sans prétraitements. Ce modèle possède un R-square de 0.994, un RMSEP de 0.8654, une LOD de 2.595% et une erreur relative de 3.8%. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le modèle PLS avec le centrage par moyenne (**Figure 30**).

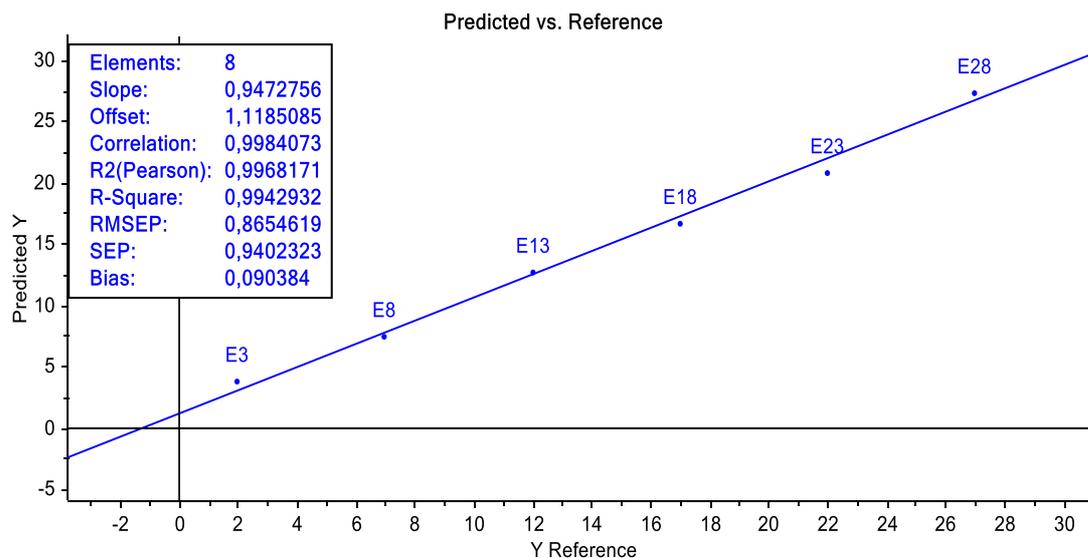


Figure 29- Les valeurs de références versus prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS sans prétraitement.

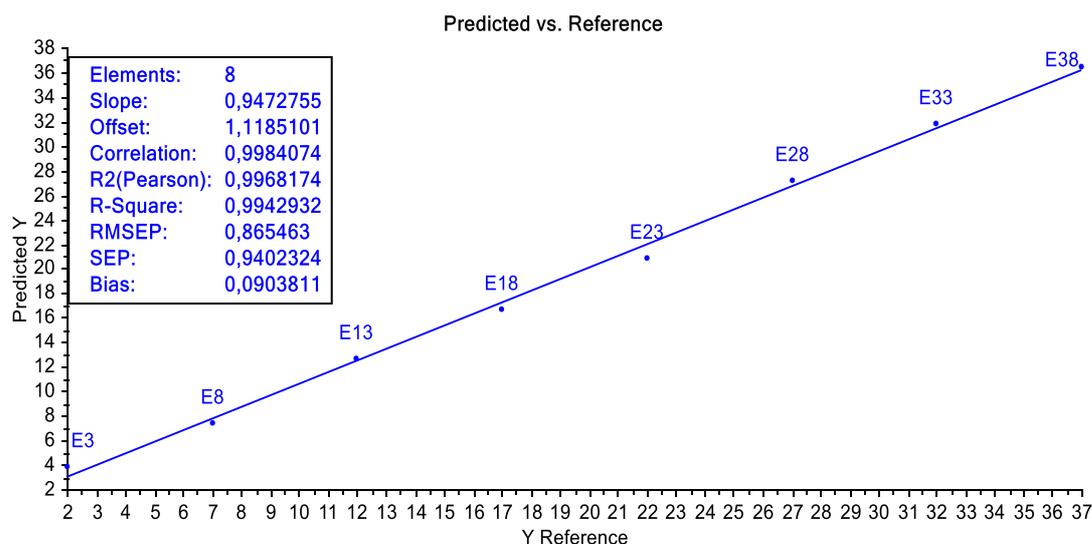


Figure 30- Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitements avec le centrage par moyenne

En deuxième position, en termes de performances prédictives, vient la PLS avec la SNV. Ce modèle possède un R-square de 0.9827, un RMSEP de 1.503, une LOD de 6.7% et une erreur relative de 4.509% (Figure 31).

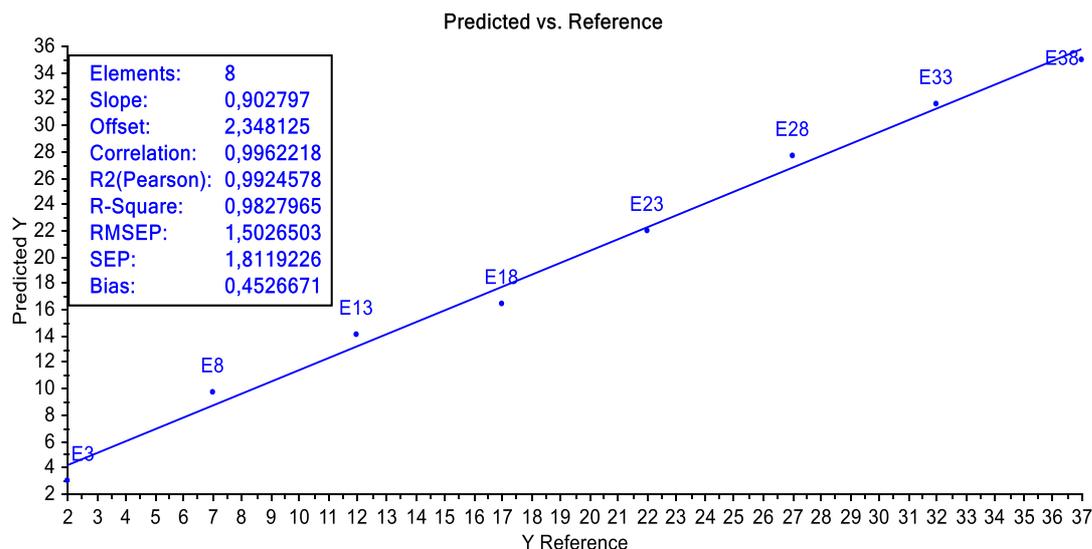


Figure 31- Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec Déviation Normale Standardisée (SNV).

Les autres modèles montrent des performances prédictives beaucoup plus faibles par rapport aux modèles précédents (**Figure 32**, **Figure 33** et **Figure 34**). Le RMSEP pour ces trois derniers modèles (SGolay, Gap Segment et Norris Gap) est respectivement de 3.37, 3.74 et 4.32. Ceci qui augmente considérablement la LOD des modèles. En ce qui concerne le R-square, il est respectivement 0.91, 0.89 et 0.85. L'erreur relative varie pour ces modèles de 14% à 19%.

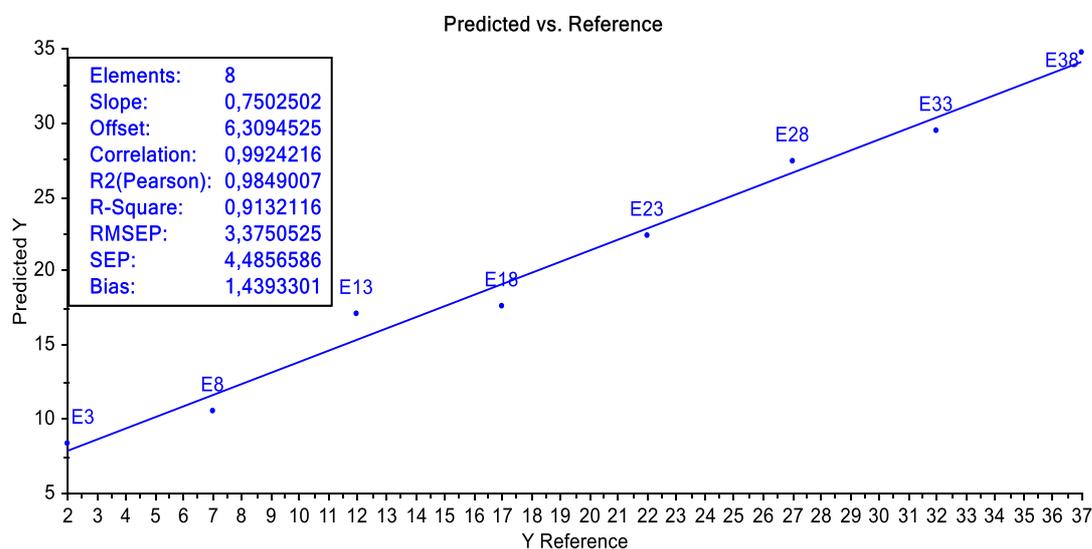


Figure 32- Les valeurs de références vs prédites du lait de vache ajoutée au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la première dérive de Savitzky-Golay.

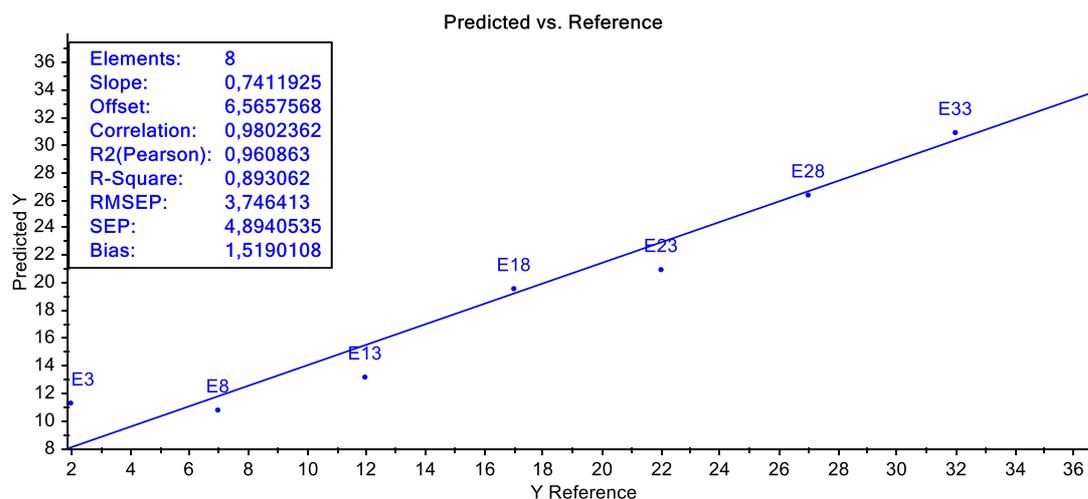


Figure 33- Les valeurs de référence vs prédites du lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la dérivée Gap Segment.

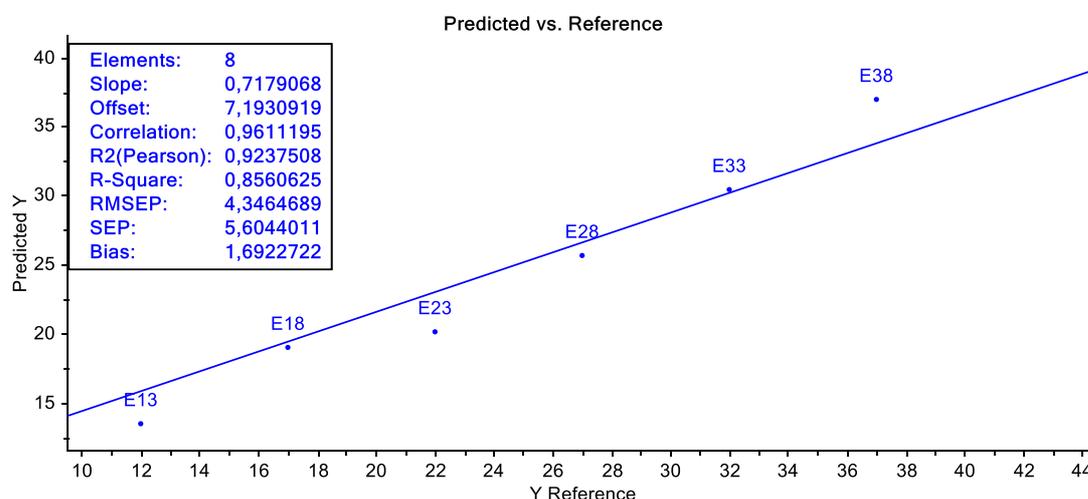


Figure 34- Les valeur de références vs prédites de lait de vache ajouté au lait de chamelle avec le modèle PLS après prétraitement avec la dérivée Norris Gap

Les résultats de tous les modèles développés sont résumés dans le **Tableau 11**.

Dans ce cas, le prétraitement diminue la performance du modèle développé. Le meilleur modèle développé était la régression PLS sans prétraitement ou avec le centrage par moyenne, le modèle donne la corrélation la plus élevée, le R-Square le plus élevé et le RMSEP le plus faible et l'erreur relative la plus faible.

Les résultats obtenus par la validation externe confirment les résultats de l'étalonnage présentés dans le **Tableau 10**. Dans l'ensemble, la performance des modèles multivariés était très prometteuse et pourrait être considérée comme une méthode efficace pour détecter une faible quantité d'adultération du lait de chamelle par le lait de vache.

Tableau 11- Les paramètres de la validation externe à l'aide de la régression PLS sans prétraitements et avec différentes méthodes de prétraitement

	Elements	Slope	Offset	Correlation	R-Square	RMSEP	SEP	Bias	Relative Error (%)	LOD (%)
No Pretreatment	8	0.947	1.119	0.998	0.994	0.865	0.940	0.090	3.80%	2.595%
Mencentring	8	0.947	1.119	0.998	0.994	0.865	0.940	0.090	3.80%	2.959%
Standard Normal Variate	8	0.903	2.348	0.996	0.983	1.503	1.812	0.453	6.70%	4.509%
Savitzky-Gloay Derivatives	8	0.750	6.309	0.992	0.913	3.375	4.486	1.439	14.90%	10.125%
Gap Segment Derivatives	8	0.741	6.566	0.980	0.893	3.746	4.894	1.519	16.40%	11.238%
Noris Gap Derivatives	8	0.718	7.193	0.961	0.856	4.346	5.604	1.692	19.20%	13.038%

LOD : limite de détection ; R-Square : coefficient de détermination ; RMSEP : Erreur quadratique de prédiction ; SEP : Erreur standard de prédiction.

IV. Conclusion

Dans cette étude, nous avons établi un modèle MIRTF-PLS capable de détecter l'adultération du lait de chamelle par addition de lait de vache. L'effet est lié à l'absorbance spécifique de la composante de chaque lait dans le spectre MIR. Les résultats de prévision obtenus à l'aide de la technique de régression PLS donnent de bonnes estimations du lait de vache ajouté au lait de chamelle, avec des erreurs relatives de 3,8% et une limite de détection de 2,595% dans la gamme spectrale entre 3000 et 920 cm^{-1} . L'analyse en composante principale a permis d'associer cette fraude à des longueurs d'ondes spécifiques et les tests des différents prétraitements des spectres ont permis de choisir le modèle le plus performant.

Cette étude montre que la procédure proposée est une méthode adéquate pour détecter l'adultération du lait de chamelle à partir du lait de vache ajouté sans prétraitement d'échantillons ni manipulation destructive. De plus, les signaux FT-MIR pourraient être collectés avec une petite tête de sonde reliée à l'appareil (portable) par fibre optique, ce qui donne la souplesse nécessaire à la surveillance de la qualité et de l'authenticité du lait de chamelle. Ceci permet aux contrôleurs d'avoir un outil rapide et efficace pour contrôler la qualité du lait de chamelle.

Chapitre 4 : détermination de l'adultération du lait par le saccharose en utilisant la spectroscopie MIR-TF et les méthodes chimiométriques.

I. Introduction

La fraude alimentaire est, en effet, une question fondamentale de l'industrie alimentaire et un souci permanent des consommateurs. Mais, il est important de souligner que, bien que la cause ou la motivation soit économique ou financière, l'effet est souvent un problème de santé publique [153], comme en témoignent plusieurs incidents de falsification de produits. En 2008, des milliers d'enfants chinois ont été victimes de problèmes rénaux, dont plusieurs cas mortels, à la suite de l'ajout de la mélamine à un produit pour nourrissons. Ces produits ont été commercialisés par une importante société laitière chinoise, ce qui a conduit au rappel de 700 tonnes de produit [154].

Face aux problèmes importants que crée l'adultération du lait pour l'industrie laitière, les programmes de salubrité des aliments doivent s'assurer de la qualité et de l'authenticité des ingrédients et des produits laitiers. L'efficacité de cette assurance qualité est liée aux outils de contrôles et d'authentification qui doivent être rapides et précis.

L'ajout d'eau au lait est une pratique courante dans les fermes. Ce qui aboutit à la production et commercialisations d'un lait de qualité inférieure avec une valeur nutritionnelle très faible. Une autre fraude commune consiste à ajouter du saccharose pour corriger le taux de matière sèche et le goût pour plier à l'addition d'eau. Cette addition d'eau rend le lait dilué et insipide, qui est pourtant vendu malgré l'ajout du saccharose et/ou de l'eau du lait.

Le saccharose ajouté dans le lait peut être déterminé par la méthode volumétrique telle que décrite par l'Organisation internationale de normalisation (ISO 5377 :1981,2009). Bien qu'il s'agisse d'une méthode de référence, elle présente certains inconvénients. C'est une méthode qui nécessite beaucoup de temps et présente des risques de pollution environnementale. Ces procédures longues coûtent cher et peuvent nécessiter une préparation intensive d'échantillons ainsi que des étapes d'extraction chimique et de filtration. Par conséquent, elle n'est pas adaptée pour les analyses de routine pour un grand nombre d'échantillons et ce malgré ses résultats précis.

Le développement de méthodes non destructives de détection d'adultérants et/ou de contaminants, qui peuvent être réalisés rapidement et à moindre coût, devient de plus en plus important pour des raisons de sécurité alimentaire, de santé publique et pour les aspects économiques de la prévention de la fraude. Une méthode alternative est possible avec l'utilisation de la spectroscopie MIR-

TF couplée à des méthodes chimiométriques. Cette méthode se base sur la spécificité des signaux IR pour l'identification des composants chimiques, et nécessitent une préparation minimale de l'échantillon.

La spectroscopie vibratoire s'est avérée être un précieux outil dans l'étude de divers domaines de la science, principalement en raison de la polyvalence des méthodes d'échantillonnage. La mesure MIR-TF donne le spectre vibratoire de l'analyte, qui peut être traité comme son « empreinte digitale », permettant une interprétation et une identification faciles. Au cours des dernières années, il y'a eu une amélioration technique considérable dans la spectroscopie MIR-TF. Des progrès dans la conception instrumentale des spectromètres MIR-TF couplés à des méthodes chimiométriques ont également été décrits, ce qui permet la détection des traces et une analyse satisfaisante.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (MIR-TF) a été appliquée pour détecter les différences de composition entre les échantillons. Cette différenciation est réalisée sur la base des vibrations de divers groupes chimiques à des longueurs d'onde spécifiques dans le moyen [155]. Les méthodes chimiométriques, en particulier la régression partielle par moindres carrés (PLS), sont parmi les techniques d'étalonnage multivarié les plus couramment utilisés [156]. Elle est basée sur un modèle bilinéaire et donne des solutions satisfaisantes dans la plupart des cas où il existe une relation linéaire ou quasi linéaire entre les spectres mesurés et la propriété cible à déterminer (par exemple, la concentration). En effet, la PLS est la technique la plus largement utilisée pour les modèles linéaires.

Comme la MIR-TF couplée à des méthodes chimiométriques fournit plus d'informations sur les fréquences et les intensités, elle a déjà été utilisée dans la détermination de la caséine dans le lait de vache [157], les protéines et le lactose dans le lait [158], la classification des types de lait [159], et la détermination des paramètres nutritionnels du yogourt [160]. Et pour souligner l'importance de la IR-TF et des méthodes chimiométriques, on peut citer que cette méthode a été aussi utilisée pour détecter la falsification de la poudre de lait écrémé [161], du beurre [13], et pour la détection des adultérations dans le mélange de lait et de fromage [162].

Dans le but de continuer à améliorer et à développer les connaissances actuelles sur les techniques d'authentification du lait, qui est un facteur clé dans l'identification d'éventuelles falsifications du lait, ce travail s'est fixé deux objectifs ; i) développer une nouvelle technique utilisant la spectroscopie MIR-TF couplée à la méthode de régression des moindres carrés partielle (PLS) et ii) étudier le potentiel de la spectroscopie MIR-TF couplée à la PLS, en tant qu'outil analytique alternatif pour la détermination de la falsification du lait cru par le saccharose.

Cette nouvelle procédure s'est avérée capable de remplacer les méthodes traditionnelles dites de références.

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage

Dans ce travail, 87 échantillons de lait cru ont été préparés avec ajout de différentes quantités de saccharose. Tous les échantillons ont été prélevés dans la région de Tadla Azilal (Maroc). Les concentrations de saccharose ajoutées variaient entre 0,01 et 19 g/L. Un lot de 60 échantillons a été préparé et analysé par spectroscopie moyen infrarouge. Et pour appliquer la méthode PLS, les échantillons ont été séparés en deux groupes. Le premier groupe est, constitué de 50 échantillons, choisis au hasard pour la calibration (noté : Cal). Le deuxième groupe, de 10 échantillons, servira pour la validation externe (noté : Val 1) du modèle préétabli.

Dans des expériences séparées, deux nouveaux ensembles (noté : Val 2 et Val 3) de 13 et 14 échantillons, respectivement, ont été préparés pour évaluer la reproductibilité du modèle.

II.2. Analyses en moyen infrarouge (MIR)

Les spectres FT-MIR ont été obtenus en utilisant un Spectrophotomètre FTIR Bruker Vector 22 équipé d'une réflectance totale atténuée (ATR) (Pike Miracle, Pike Technologies, Madison, Etats-Unis) et avec un détecteur DTGS, une source Globar et un séparateur KBr, avec une résolution de 4 cm^{-1} . En moyenne 98 scans par spectre ont été enregistrés, en mode absorbance dans le domaine 3100-920 cm^{-1} . Les mesures ont été effectuées à température ambiante et un spectre de référence a été recueilli avant toutes les mesures des échantillons.

En suivant les gammes des études précédentes [159]. Deux différentes gammes spectrales ont été étudiées pour chacune des gammes d'étalonnage mentionnées ci-dessus. La gamme spectrale de 3100-920 cm^{-1} a été utilisée comme point de départ de l'enquête, où tous les composés du lait devraient absorber. La gamme spectrale réduite de 1800-920 cm^{-1} a également été utilisée, car *Moros et al.* [160] ont montré que cette gamme spectrale présente les bandes les plus caractéristiques pour les constituants du lait cru.

II.3. Méthodes chimiométriques

Le point de départ de l'analyse chimiométrique est le prétraitement spectral réalisé avant le développement d'un modèle d'étalonnage optimal. Habituellement, on utilise comme prétraitement spectral la première ou la seconde dérivée (en utilisant les algorithmes Gap-Norris et Savitzky-Golay)[101,163] ou l'application de la normalisation des spectres (Standard Normal Variate, SNV) [150].

III. Résultats et discussion

III.1. Spectres MIR-TF du lait

La **Figure 35** montre les spectres d'absorption MIR-TF d'échantillon de lait cru et de lait falsifié dans la plage spectrale de 920 à 3100 cm^{-1} . Les spectres montrent de nombreux pics correspondant aux différentes liaisons moléculaires des composants du lait en interaction avec le rayonnement MIR.

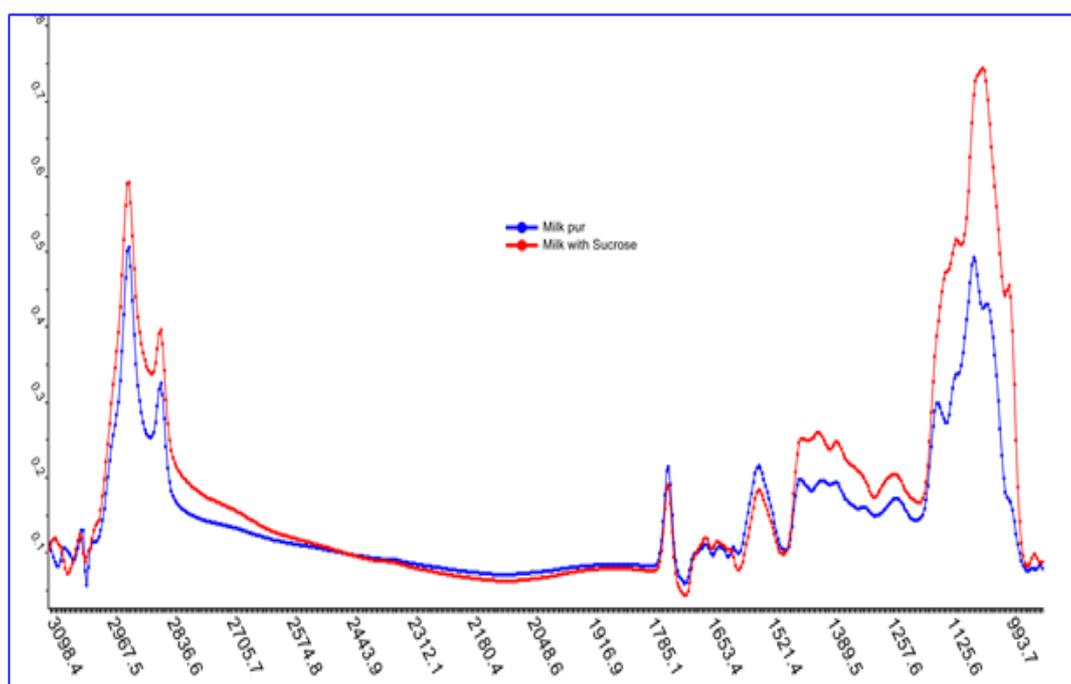


Figure 35- Spectres moyen infrarouge du lait cru sans ajout de saccharose (bleu) et du lait avec ajout de saccharose.

La figure 36 montre une différence significative entre les spectres de lait pur (bleu) et de lait falsifié avec du saccharose (rouge). On a, par ailleurs, pu discerner dans les spectres les pics caractéristiques de la matière grasse, à savoir les vibrations d'élongation asymétriques à 2960 cm^{-1} , et symétriques à 2860 cm^{-1} qui sont des vibrations caractéristiques du méthyle ($-\text{CH}_3$) et du méthylène ($-\text{CH}_2$). On outre, la bande spectrale à 1750 cm^{-1} a été dominée par l'interaction du rayonnement MIR avec des groupes $\text{C}=\text{O}$ des fonctions ester présentes dans la fraction grasse du lait (triglycérides).

Les protéines du lait ont été révélées par les deux bandes spectrales situées autour de 1650 cm^{-1} et 1520 cm^{-1} , elles sont particulièrement caractéristiques des fonctions amides des protéines. Cependant, les bandes à 1112 cm^{-1} et 1050 cm^{-1} sont dominées par les vibrations d'élongation des liaisons $\text{C}-\text{O}$ [164].

III.2. Elaboration du modèle de calibration

Les caractéristiques spectrales dans le MIR de différentes concentrations de saccharose ajoutées au lait, ont été étudiées ; d'abord la région entre 3100 et 920 cm^{-1} , et ensuite la région entre 1800 et 920 cm^{-1} du spectre complet ont été utilisés pour construire le modèle PLS de calibration. Le **Tableau 12** représente les résultats obtenus lorsque les données sont traitées et analysées par la PLS.

Sur le tableau ci-dessous, on constate que les erreurs de calibration et de validation croisée varient considérablement. Les RMSEC varient de 0,3642 à 0,5468 g/L alors que les RMSECv varient de 0,4317 à 0,5737 g/L.

Ainsi, les R^2c et R^2cv sont significativement variables en fonction des prétraitements et la zone spectrale exploitée. Par application de la PLS, les R^2c sont compris entre 0,99 et 0,9981 et les R^2cv varient de 0,99 à 0,9978.

Le nombre optimal de PLS (LVs) a été choisi selon la méthode de validation croisée totale qui se base sur l'erreur minimale de RMSECv. Il n'est pas possible de savoir à priori lequel des prétraitements et de la zone spectrale donneront les meilleurs résultats. Par conséquent, la solution est de tester de manière systématique les différents prétraitements et de sélectionner celui donnant l'erreur standard la plus faible. En général, la zone 3100-920 cm^{-1} a donné la valeur de RMSEC inférieure à celle donnée par la zone 1800-920 cm^{-1} .

Le meilleur coefficient de détermination de calibration R^2c (0,996), de RMSEC (0,364) de R^2cv (0,9948) et de RMSECv (0,4317) ont été obtenus avec un prétraitement de la première dérivée Savitsky Golay dans la région de 3100-920 cm^{-1} .

Les coefficients de détermination R^2c et les R^2cv sont proches de 1, ce qui indique une forte corrélation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites du saccharose ajouté au lait. La **Figure 36** représente les valeurs prédites par le modèle PLS en fonction des valeurs de référence. Elle présente le modèle PLS le plus performant et les valeurs mesurées par rapport à la prévision des concentrations de saccharose ajoutées. Les échantillons d'étalonnage sont représentés en bleu et les échantillons de validation croisée en rouge.

Il convient de souligner que tous les échantillons (calibration et la validation croisée totale) se situent le long de la ligne d'étalonnage. La PLS a, ainsi, montré un bon ajustement entre les valeurs de référence et les valeurs prédites dans le MIR pour l'adultération du lait par le saccharose.

Tableau 12- Paramètres statistiques obtenu par PLS modélisations lors de la calibration.

		PLS avec validation croisée totale				
		Saccharose ajouté (0 à 19 g/l)				
Prétraitement	Nombre d'onde (cm-1)	Nbr de LVs	R2c	RMSEC	R2cv	RMSEC _v
Brut	3100-920 ^a	2	0,994	0,4201	0,9942	0,4427
	1800-920 ^a	2	0,99	0,5468	0,99	0,5737
S.Golay 1st Dérivée	3100-920 ^a	2	0,9959	0,3642	0,9948	0,4317
	1800-920 ^a	2	0,9981	0,4542	0,9978	0,4729

LVs est nombre de Latentes ; R2c et R2cv sont les coefficients de détermination de calibration et de validation croisée respectivement ; RMSEC et RMSEC_v sont l'erreur de calibration et de validation croisée respectivement ; ^a zone spectrale exploitée ;

Une valeur faible de R2c dans l'étape de calibration peut servir d'indicateur d'une faible capacité prédictive d'un modèle, mais la R2c élevée (proche de 1) n'implique pas automatiquement une capacité prédictive élevée du modèle [121], [165]. Un coefficient de détermination (R2c et R2p) proche de 1, est une condition nécessaire mais pas suffisante.

Il n'est pas possible de savoir à priori lequel des modèles donneront les meilleurs résultats de prédiction et robustesse. Apparemment, la seule façon d'estimer la véritable puissance prédictive d'un modèle est de le tester sur un lot d'échantillons externes (validation externe). Le choix du modèle se fera sur la base de l'erreur de prédiction la plus faible.

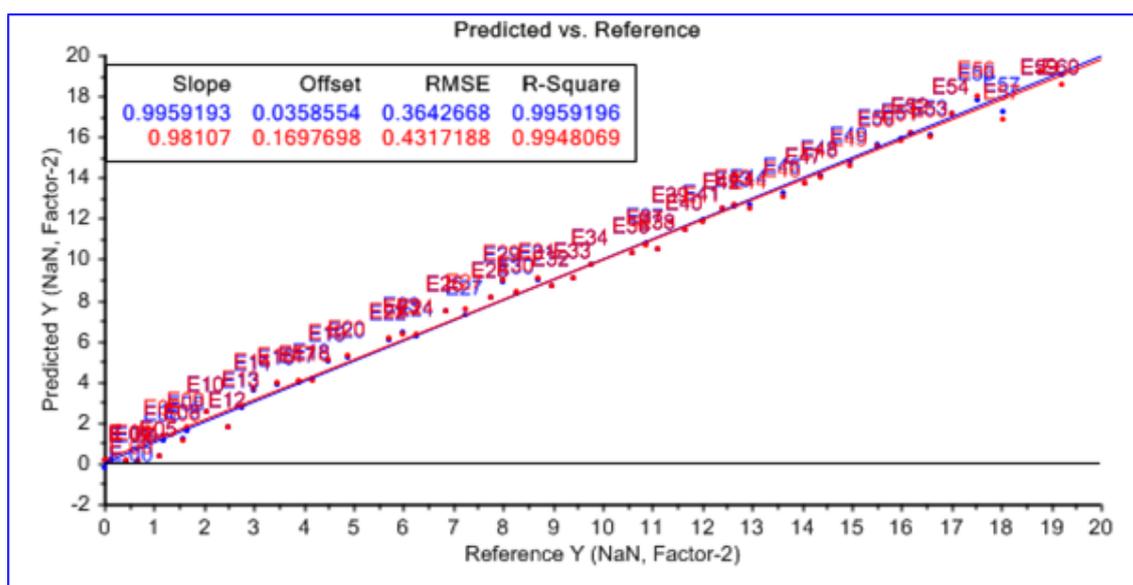


Figure 36- valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de calibration (bleu) et dans l'étape de validation croisée (rouge) ; quand PLS est appliqué sur les données spectrales dérivée dans la zone 3100-920 cm⁻¹.

III.3. Validation externe

Les modèles obtenus ont été appliqués aux sous-ensembles de données de validation externe, composés de 10, 13 et 14 échantillons. Tous les résultats de la validation externe sont résumés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13- Paramètres statistiques obtenu par PLS modélisations du saccharose ajouté au lait, lors de la validation externe.

Validation externe du saccharose ajouté au lait par PLS							
Modèle	LVs	R ² _p	RMSEP (g/L)	RE%	LOD (g/L)	Zone spectrale	Prétraitement
Val 1	2	0,998	0,50	5,0	1,51	3100-920 ^a	S.Golay 1st Dérivée
	2	0,998	0,45	4,5	1,34	1800-920 ^a	
Val 2	2	0,997	0,57	7,3	1,70	3100-920 ^a	S.Golay 1st Dérivée
	2	0,997	0,42	5,4	1,25	1800-920 ^a	
Val 3	2	0,995	0,45	7,8	1,34	3100-920 ^a	S.Golay 1st Dérivée
	2	0,997	0,45	5,6	1,34	1800-920 ^a	
Moyenne des trois validations	2	0,997±0,001	0,506±0,059	6,712±1,499	1,52±0,177	3100-920 ^a	S.Golay 1st Dérivée
	2	0,997±0,001	0,438±0,018	5,144±0,605	1,31±0,053	1800-920 ^a	

RMSEP est l'erreur liée à la prédiction (validation externe); R²_p est le coefficient de détermination de prédiction (validation externe); RE% est l'erreur relative de prédiction en % ; LOD est la limite de détection en g/l ; ^a zone spectrale exploitée ;

Les modèles PLS ont été testés sur trois ensembles externes de données. Sur le tableau ci-dessus, les R²p, ER%, LOD et RMSEP sont variables en fonction des prétraitements et de la zone spectrale utilisés.

Dans les trois tests de validations, les erreurs de prédiction (RMSEP) varient de 0,417 à 0,566 g/L et les erreurs relatives de prédiction (ER%) varient de 4,46 à 7,849. Ainsi, les coefficients de détermination (R²p) sont compris entre 0,995 et 0,998, alors que les limites de détection (LOD) sont comprises entre 1,25 et 1,70 g/L.

Le meilleur modèle PLS (avec ER en% et LOD les plus faibles) ont été établis avec des données spectrales MIR de la zone de 1800-920 cm⁻¹ (**Tableau 14**) avec la première dérivée Savitsky Golay comme prétraitement.

Tableau 14- Paramètres statistiques obtenus par PLS modélisations données MIR dans la gamme spectrale de 1800 à 920 cm⁻¹ avec la première dérivée de Savitsky Golay comme prétraitement.

Validation externe du saccharose ajouté au lait par PLS					
Modèles	LVs	R ² p	RMSEP	RE%	LOD
Val 1	2	0,998	0,45	4,5	1,34
Val 2	2	0,997	0,42	5,4	1,25
Val 3	2	0,997	0,45	5,6	1,34
Moyen de trois validations	2	0,997±0,001	0,440±0,017	5,167±0,586	1,310±0,052

Sur le tableau ci-dessus, la première validation externe (Val 1) a donné un coefficient de détermination (R²p) de l'ordre de 0,998, une erreur de prédiction (RMSEP) de l'ordre de 0,45 g/l, une erreur relative de prédiction (RE%) égale à 4,5% et une limite de détection (LOD) égale à 1,34 g/l. La seconde validation (Val 2) a donné un R²p de l'ordre de 0,997, un RMSEP est égale à 0,42 g/l, une RE% de l'ordre de 5,4% et une LOD est égale à 1,25 g/l. La troisième validation (Val 3) a donné un R²p de 0,997, RMSEP de l'ordre de 0,45 g/l, une RE% égale à 5,6% et la LOD est égale à 1,34 g/l.

La moyenne de ces trois validations en termes de R²p est égale à 0,997±0,001, pour le RMSEP elle est de 0,440±0,017, le RE% est égale à 5,167±0,586, et la LOD est égale à 1,310±0,052 g/l.

Les coefficients de détermination de prédiction sont proches de 1, ce qui indique une forte corrélation entre les valeurs de référence et les valeurs du saccharose ajouté au lait prédit par SMIR. Ainsi la linéarité du modèle PLS préétabli est bien vérifiée.

Sur les trois figures ci-dessous (**Figure 37**, **Figure 38** et **Figure 39**) qui représentent les valeurs prédites par le modèle PLS en fonction des valeurs de référence dans l'étape de validation externe, la linéarité du modèle PLS est bien vérifiée, avec tous les échantillons (Etalonnage et validation externe) qui sont localisés le long de la ligne de calibration. Les valeurs prédites et les valeurs de référence sont présentées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 - Comparaison des valeurs de références versus prédites des modèles de tests de validation externe.

Ref. : Reference ; Predi. : Prédiction.

PLS/1800-920 cm ⁻¹								
Val 1			Val 2			Val 3		
Ref.	Predi.	Ecart	Ref.	Predi.	Ecart	Ref.	Predi.	Ecart
0,58	-0,0219	0,6019	7,746	8,2919	-0,5459	8,281	8,8183	-0,5373
1,187	0,8426	0,3444	10,589	10,9666	-0,3776	11,646	11,8534	-0,2074
2,332	2,2809	0,0511	14,052	13,9722	0,0798	15,511	15,1931	0,3179
3,3	3,5475	-0,2475	18,035	17,4278	0,6072	18,388	17,7281	0,6599
5,36	5,8712	-0,5112	0,732	0,0478	0,6842	0,126	-0,8131	0,9391
6,578	7,1659	-0,5879	1,111	0,6779	0,4331	0,925	0,3479	0,5771
10,221	10,5659	-0,3449	1,619	1,3146	0,3044	1,455	1,1182	0,3368
13,191	13,1754	0,0156	2,104	1,8999	0,2041	1,942	1,722	0,22
17,264	16,7228	0,5412	2,833	2,9075	-0,0745	2,41	2,3723	0,0377
18,388	17,7281	0,6599	3,394	3,6186	-0,2246	3,168	3,2992	-0,1312
			4,083	4,4234	-0,3404	3,738	4,0316	-0,2936
			4,591	5,0294	-0,4384	4,358	4,6637	-0,3057
			5,174	5,7162	-0,5422	4,89	5,3193	-0,4293
						5,523	5,9521	-0,4291

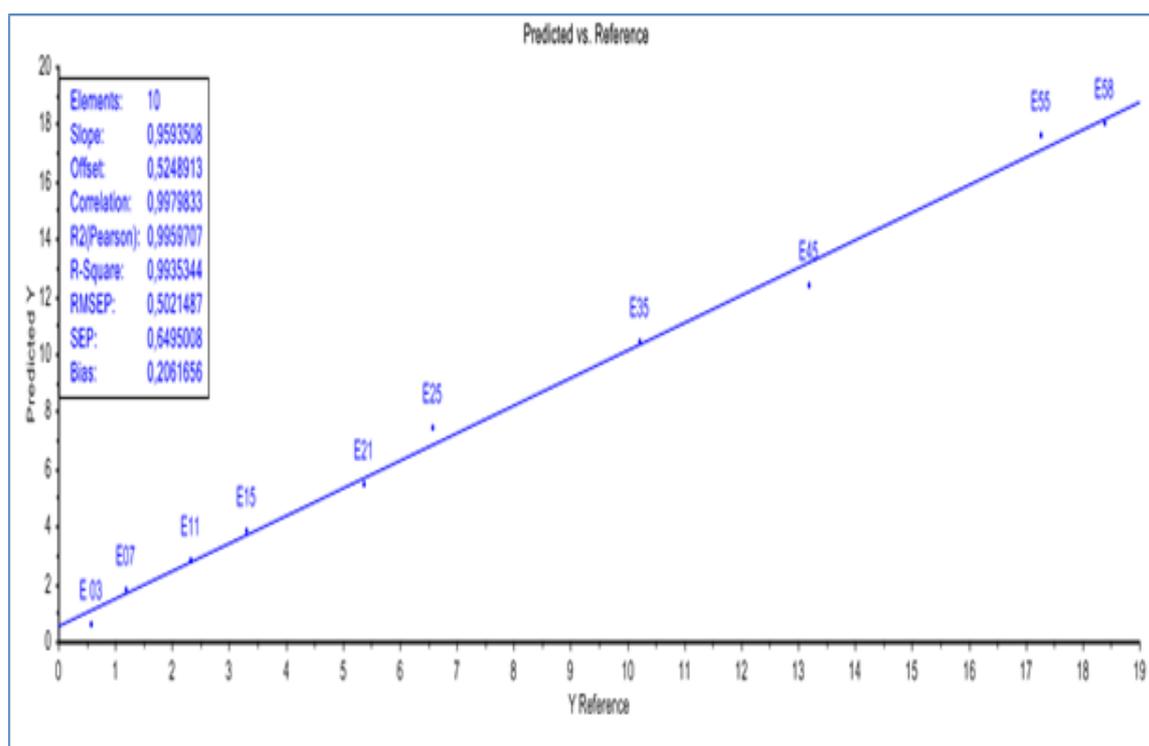


Figure 37- Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 1).

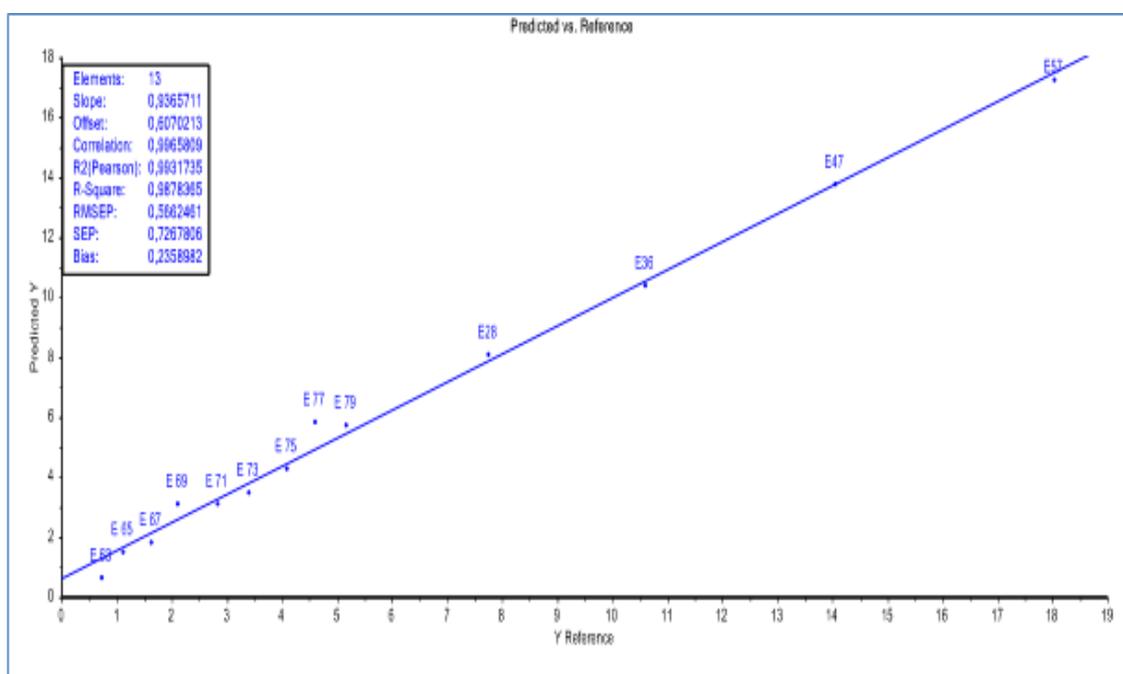


Figure 38- Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 2).

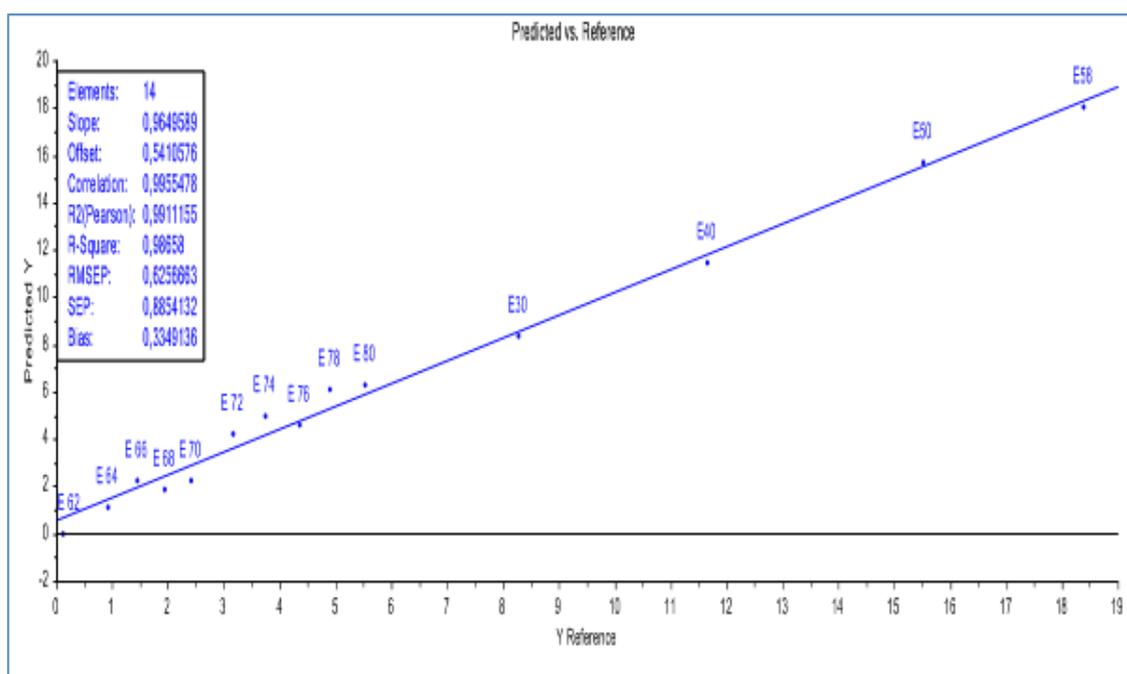


Figure 39- Valeur de référence versus prédites du saccharose ajouté au lait dans l'étape de validation externe (Val 3).

Sur le Tableau 15, l'écart entre les valeurs prédites et les valeurs de références pour le modèle PLS pour la première validation externe (val 1) varie de -0,5879 à 0,6599, il varie de -0,5459 à 0,6842 pour la seconde (val 2) et de -0,5373 à 0,9391 pour la troisième (val 3). Les écarts obtenus des trois validations externes (qui sont séparés dans le temps) prouvent la reproductibilité du modèle de calibration préétabli.

IV. Conclusion

Dans cet article, nous avons établi un modèle IRTF-PLS capable de détecter l'adultération du lait cru avec addition de saccharose. L'effet est lié à l'absorbance spécifique du saccharose dans le spectre MIR.

La chimiométrie combinée à la spectroscopie MIR-TF s'est révélée être une excellente méthode pour identifier des substances en fournissant des spectres d'empreintes digitales uniques.

On a constaté que les erreurs de prédiction relatives en pourcentage étaient aussi faibles (4,5 à 5,6%) pour la validation externe. Les modèles PLS ont donné une Limite de détection (LOD) de 1,25 à 1,34g/L. Les validations externes des modèles PLS ont montré des performances en termes des valeurs de l'erreur relative (RE%) et de LOD pour le lait adultéré avec du saccharose.

Dans l'ensemble, la performance des modèles multivariés est très prometteuse et pourrait être considérée comme une méthode efficace pour détecter de faibles quantités d'adultérant dans le lait. Les résultats de prédiction obtenus à l'aide de la technique de régression PLS donnent de bonnes

estimations de la teneur en saccharose ajoutée au lait, avec des erreurs évidentes de $5,1 \pm 0,6$ et de LOD (g/L) de $31 \pm 0,05$ dans la gamme spectrale entre 1800 et 920 cm^{-1} .

Cette étude montre que la spectroscopie FT-MIR couplée à la PLS, est une méthode adéquate pour la détection et la quantification de l'adultération du lait cru avec du saccharose, et ce sans aucun prétraitement de l'échantillon ni aucune manipulation destructive.

La méthode développée dans ce travail peut être utilisée en industrie laitière pour la détection et la quantification de la fraude du lait par ajout de saccharose. De plus, les signaux MIR-TF pourraient être collectés avec une petite tête de sonde reliée à l'appareil (portable) par fibre optique, ce qui donnerait la flexibilité nécessaire à la surveillance des processus en ligne.

Chapitre 5 : Evaluation de l'analyse du lait par spectroscopie MIR-TF pour déterminer le point de congélation sous différentes conditions analytiques.

I. Introduction

Le point de congélation (FP) d'un liquide constitué d'eau et de solutés correspond à la température à laquelle l'eau liquide et la glace sont en équilibre. Le FP du lait est inférieur à celui de l'eau car la présence de solutés abaisse cet indicateur. Cette propriété est mesurée pour déterminer si le lait de vache a été dilué avec de l'eau ce qui lui vaut d'être utilisée comme norme légale [30]. Le lait constitué principalement d'eau mais le FP est la propriété la plus constante des caractéristiques du lait. Cette faculté est liée à l'équilibre physiologique existant entre la pression osmotique du sang et celle du lait. Le FP du lait de vache est compris entre $-510 \text{ m}^\circ\text{C}$ et $-530 \text{ m}^\circ\text{C}$ [31].

Malgré cette cohérence, les FP peuvent subir de légères fluctuations dues aux variations de la composition du lait. Mais, la cause principale est la dilution du lait avec l'eau par des intentions frauduleuses ou des erreurs de manipulation (pousse à l'eau), ce qui réduit la concentration du lactose est considéré comme la cause principale de la diminution de le FP. L'hydrolyse du lactose entraîne un abaissement du point de congélation du lait et la libération du galactose. En fait, une corrélation linéaire a été trouvée entre l'abaissement cryoscopique et la quantité de galactose libérée [166]. L'acidité du lait par la fermentation lactique provoque la diminution de FP ; $1 \text{ }^\circ\text{D}$ abaisse le FP de $0,004 \text{ }^\circ\text{C}$. Par ailleurs, la pasteurisation du lait entraîne une augmentation de $0,002 \text{ }^\circ\text{C}$ par rapport au FP. En général, les facteurs affectant la composition du lait ont également des effets sur le FP [31].

Il est important de noter que l'eau forme un arrangement hexagonal précis lorsqu'elle atteint son point de congélation. Cet arrangement augmente le volume d'eau et réduit sa densité. Cette caractéristique est importante dans la fabrication des produits laitiers glacés, ce qui peut entraîner la formation de cristaux de glace [26]. La surveillance de ce paramètre est également importante dans l'industrie laitière.

La cryoscopie à thermistance est la méthode de référence pour la détermination de le FP telle que définie par la norme ISO5764 : 2002 (IDF 108 : 2002). La mesure est basée sur le principe de la congélation du lait et de sa cristallisation par agitation mécanique, elle est effectuée lorsque la température du lait congelé ne change pas pendant 20s pour pas plus de $0,5\text{m}^\circ\text{C}$. La présence d'eau dans le lait est déterminée par la mesure du FP. Le lait est constitué principalement d'eau, mais la présence d'eau étrangère entraîne des modifications de l'équilibre osmotique du lait. La mesure du FP du lait, qui détermine la présence de l'eau dans ce dernier, dépend de la concentration en constituants

solubles dans l'eau et la concentration en lactose qui est le constituant principal qui explique la variation de la FP du lait [167].

La directive européenne (directive du Conseil 92/46/CE, Communauté européenne, 1992) précise que le lait de vache destiné à la consommation humaine doit avoir un FP ne dépassant pas $-520\text{m}^\circ\text{C}$. Une étude a montré que, dans la plupart des cas, les laits de troupeaux dont le point de congélation était supérieur au seuil de $-0,520^\circ\text{C}$ étaient en réalité mouillés. Néanmoins, des apports d'eau étrangère ont été détectés en dessous de cette valeur. De plus, la possibilité qu'un troupeau produise du lait avec un point de congélation authentique supérieur à $-0,520^\circ\text{C}$ ne peut pas être exclue [168]. Cependant, il faut tenir compte des variations naturelles de la composition du lait cru et de l'ajout inévitable d'eau à certaines manipulations du lait au cours de la production et de la transformation. Par exemple, le Règlement n°2597 (Communauté européenne, 1997) a déterminé que ce lait devrait avoir un FP proche de la moyenne des FP pour le lait cru provenant de la zone de collecte. Ceci est particulièrement important lorsque le FP fait partie des critères utilisés dans les programmes de paiement du lait.

L'analyse d'un grand nombre d'échantillons de lait implique des instruments infrarouges à transformée de Fourier. Cet équipement automatique fournit des informations complètes sur la composition du lait. Les résultats sont obtenus à l'aide de modèles d'étalonnage capables d'extraire les informations contenues dans les données spectrales des échantillons. D'autres instruments combinés sont capables de fournir un dénombrement des cellules somatiques en plus de la composition du lait. Ces équipements peuvent être entièrement automatiques et trouvent leur intérêt dans les programmes d'amélioration des troupeaux laitiers. En effet, leur cadence élevée permet de suivre la qualité du lait individuel des vaches.

Dans certaines conditions, des conservateurs sont ajoutés aux échantillons de lait avant d'être acheminés vers les laboratoires de contrôle de la qualité. La conservation des échantillons permet de reconstituer les paramètres de qualité pendant la durée séparant l'échantillonnage de la réalisation des analyses.

Dans le cas des programmes de paiement du lait et de l'amélioration du cheptel laitier, des conservateurs sont utilisés pour la détermination des cellules somatiques [169]. De même pour la détermination de la graisse, de la protéine et du lactose par des analyseurs à infrarouge [170].

L'utilisation de conservateurs entraîne des variations dans les résultats obtenus avec le lait de vache [171]. Une étude a été réalisée sur les effets des conservateurs sur la composition et les cellules somatiques du lait de chèvre avec CombiFoss 6000 FC (Foss Electric, Hillerød, Danemark) [172]. Cet analyseur de lait combine deux dispositifs, Fossomatic FC (compteur de cellules somatiques) et Milkoscan FT 6000 (analyseur infrarouge à transformée de Fourier). Le dernier dispositif a fait l'objet d'une étude sur les effets des agents de conservation sur la détermination du facteur de production pour le lait de chèvre. Les conservateurs étudiés étaient Bronopol et Azidiol [173].

Les facteurs influençant la détermination du FP sont le conservateur utilisé, la température de stockage et l'âge du lait [172]. Étant donné que les agents de conservation sont largement utilisés dans la préparation des échantillons de lait, il convient de prendre en compte les effets de leurs différentes concentrations sur le FP lors de la vérification de tout ajout d'eau. En ce sens, l'utilisation de conservateur suppose une addition de soluté au lait, de sorte que ses effets pourraient être intéressants pour l'interprétation des résultats du FP.

Le Milkoscan FT2 (Foss Electric) est un analyseur de lait basé sur la technologie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF). Il fournit une multitude de paramètres pour le contrôle de la qualité. L'analyse effectuée en 30s donne à la fois la teneur en graisse, protéines, lactose, matière sèche (totale et dégraissée), urée, acidité dornique, caséines, acide citrique, acides gras libres, densité et abaissement du point de congélation. Ce dernier paramètre est mesuré par un conductimètre intégré au circuit de pompage du lait lors de l'analyse.

Le but de ce travail est d'étudier l'influence de différentes méthodes de conservation sur la détermination du FP par la méthode Milkoscan FT2 et la cryoscopie à thermistance (méthode de référence).

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage

Vingt-cinq échantillons de lait de 5 000 ml ont été obtenus auprès d'un centre de collecte de lait de vache (situé à Fkih Ben Salah dans la région de Tadla-Azilal au Maroc) au cours du mois d'avril 2016. Chaque échantillon a été divisé en quarante portions de 100mL pour préparer les différentes conditions d'analyse. Ces conditions analytiques dépendent de la quantité d'eau à ajouter (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7% du volume total) et du conservateur utilisé : sans conservateur (WPR), conservation au peroxyde (20 ou 40 μ L/100mL, correspondant respectivement à PER20 et PER40) et à la préservation avec du dichromate de potassium (20 ou 40 μ L de dichromate de potassium 1% / 100mL correspondant respectivement aux BCR20 et BCR40).

Par conséquent, un total de 40 conditions analytiques a été examiné pour chaque méthode, en fonction de la combinaison de la méthode de conservation et de la quantité d'eau ajoutée. Pour la préparation de dichromate de potassium à 1%, 1g de dichromate de potassium (Panreac, 99%) a été dissous dans 100mL d'eau distillée. Le peroxyde (Merck, 30% pour analyse) a été utilisé directement dans l'échantillon de lait.

La composition physico-chimique du lait (matières grasses, protéines totales, lactose et matières solides totales) des échantillons de lait a été déterminée à l'aide d'un appareil Milkoscan FT 2 (Foss Electric). Avant de passer par Milkoscan FT2, les échantillons de lait ont été chauffés à 40°C

pendant 20min [174]. Le **Tableau 18** montre les résultats obtenus pour les échantillons de lait cru utilisés dans cette étude.

Tous les échantillons de lait ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse de le FP, toujours effectuée le jour de la collecte. Les valeurs de FP de chaque aliquote ont été déterminées en double selon la méthode de référence [175] en utilisant le cryoscope à thermistance (Cryoscope avancé, modèle 4D3, Advanced Instrument Inc.), en mode de recherche de plateau selon IDF108: 2002 / ISO5764 [172] et la méthode Milkoscan FT2. .

Avant et pendant l'expérience, le cryoscope à thermistance a été étalonné à l'aide de solutions standard de NaCl conformes à la norme internationale [175]. La calibration du Milkoscan FT2 a été réalisée à l'aide d'échantillons de lait de vache dans lesquels les valeurs de référence de FP ont été déterminées par le cryoscope à thermistance (plage de -450 à -590m°C). Au total, 4000 valeurs de FP ont finalement été traitées. Les résultats du FP ont été exprimés en millicelsius selon la norme internationale [175].

II.2. Analyses statistiques

Les résultats obtenus par les deux méthodes dans les différentes conditions analytiques ont été examinés en comparant les moyennes, les écarts types de répétabilité et l'analyse de régression. Les moyens ont été analysés en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS V9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Le modèle utilisé pour intégrer les effets des 40 conditions analytiques, des deux méthodes analytiques et de l'effet de l'échantillon (n=25) ainsi qu'un effet résiduel lié à la détermination en double du FP réalisée pour les deux méthodes.

L'écart type de répétabilité (Sr) et sa valeur relative ($Sr\%$) ont été calculés pour chaque condition analytique conformément à la IDF128A [176] avec les équations 26 et 27:

$$\text{Équation 26 : } Sr = \sqrt{\left(\frac{1}{2q} \sum_{i=1}^q Wi^2\right)}$$

$$\text{Équation 27 : } Sr \% = Sr * 100/\bar{x}$$

Où q est le nombre d'échantillons, Wi est la différence absolue entre les résultats dupliqués, et \bar{x} est la moyenne arithmétique du FP.

Pour établir la relation entre la méthode de référence et la méthode Milkoscan FT2, une régression linéaire a été effectuée pour les 40 conditions analytiques étudiées. La régression linéaire a été effectuée à l'aide de la procédure REG du logiciel SAS V9.1.3. Le module a permis l'estimation des coefficients de détermination (R^2), du coefficient de régression (a) et de l'interception (b).

La procédure GLM du logiciel SAS V9.1.3 a également été utilisée pour étudier les effets de différentes variables, à savoir : L'effet de l'ajout d'eau (8 classes : 0 à 7%), l'effet du conservateur (5 classes : WPR, BCR20, BCR40, PER20 et PER40), la méthode d'analyse (deux classes : méthode de référence et méthode Milkoscan FT2), l'effet de l'échantillon ($n=25$) et les interactions factorielles de ces effets à $n=2$ et $n=3$.

III. Résultats et discussion

Le **Tableau 16** compare les valeurs moyennes de FP obtenues par la méthode Milkoscan FT2 et la méthode de référence dans les conditions analytiques étudiées. Les résultats obtenus avec la méthode Milkoscan FT2 (-525 à $-477m^{\circ}C$) étaient inférieurs à ceux obtenus avec la méthode de référence (-523 à $-476m^{\circ}C$), et la valeur absolue de l'écart moyen entre les valeurs de La FP obtenue avec les deux méthodes était de $3,12m^{\circ}C$.

En prenant les moyennes des déviations enregistrées par stratégie de conservation, les différences enregistrées étaient de $1,38m^{\circ}C$, $1,72m^{\circ}C$, $2,26m^{\circ}C$, $4,27m^{\circ}C$ et $5,99m^{\circ}C$ correspondant, respectivement, à WPR, BCR20, BCR40, PER20, et PER40. Les écarts les plus importants ont été enregistrés avec les deux stratégies PER20 et PER40. La déviation moyenne des échantillons de BCR20 et de BCR40 dans les conditions analytiques était de $1,99m^{\circ}C$ comparée à $5,13m^{\circ}C$ enregistrée avec les échantillons PER20 et PER40.

Pour les moyennes des déviations enregistrées en pourcentage d'addition d'eau, les déviations enregistrées étaient de $2,8m^{\circ}C$, $2,7m^{\circ}C$, $3,15m^{\circ}C$, $2,69m^{\circ}C$, $3,32m^{\circ}C$, $3,44m^{\circ}C$, $3,03m^{\circ}C$ et $3,84m^{\circ}C$ correspondant, respectivement, à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7%). La différence moyenne entre les deux méthodes augmente légèrement avec l'ajout d'eau. La différence la plus faible avec les échantillons de BCR20 ($0,27m^{\circ}C$) et la déviation la plus élevée avec les échantillons de PER40 ($10,29m^{\circ}C$) ont été enregistrées avec une addition d'eau de 5%.

En général, les écarts enregistrés montrent le faible effet de l'ajout d'eau sur les valeurs du FP. Cependant, l'utilisation du peroxyde dans la conservation des échantillons conduit à des valeurs très élevées par rapport à la méthode de référence. Les différences enregistrées avec les échantillons conservés avec du bichromate de potassium ont enregistré des écarts légèrement supérieurs à ceux sans agent de conservation (WPR).

La méthode Milkoscan FT2 a montré un Sr relatif moyen légèrement supérieur de 0,26% à celui indiqué à l'annexe A de la norme IDF108: 2002 / ISO5764 [175] et légèrement supérieur à celui obtenu avec la méthode de référence (0,24%). Les résultats obtenus en termes de Sr% sont cohérents avec les résultats de Sánchez et al. [173] qui avaient un Sr% de 0,2% pour la méthode officielle et Milkoscan FT6000.

Le pourcentage maximum de Sr obtenu avec la méthode de référence était de 0,35% dans les échantillons PER20 additionnés de 5% et celui obtenu avec la méthode Milkoscan FT2 (0,35%) avec 7% dans les échantillons BCR40 et sans agents de conservation. Les petites différences observées de Sr dans les diverses conditions d'analyse suggèrent que ce paramètre n'a pas été modifié par l'ajout d'eau ou de conservateurs dans les deux méthodes.

Le **Tableau 17** présente les résultats de l'analyse de régression entre la méthode de référence et la méthode Milkoscan FT2 pour les conditions analytiques étudiées.

Le coefficient de corrélation le plus élevé a été enregistré dans les échantillons de BCR40 avec 3% d'eau ($r = 0,981$) et avec 5% d'eau ($r = 0,981$). Pour les échantillons contenant 0 à 1% d'eau ajoutée, la pente et l'interception étaient, respectivement, différentes ($p < 0,05$) de 1,00 et de 0,00 pour les échantillons de BCR 20 et sans agent de conservation (WPR). En dépassant 3% d'eau ajoutée, la même remarque a été faite pour les autres stratégies de conservation WPR et BCR40.

Les meilleurs coefficients de régression ont été enregistrés avec des échantillons de BCR20 pour des pourcentages d'eau de 0 à 2% et des échantillons de BCR40 et PER20 pour des pourcentages de 0%, 1% et 3%. La plus grande précision a été obtenue avec des échantillons contenant moins de 3% d'eau.

Sur la base des résultats de l'analyse de régression, la détermination de la teneur en eau ajoutée par la méthode Milkoscan FT2 doit être confirmée par la méthode de référence, en particulier lorsque des niveaux élevés sont suspectés. Cependant, dans une étude de Milkoscan FT 6000, l'utilisation de Bronopol et d'Azidiol donne la plus grande précision pour les échantillons contenant plus de 3% d'eau. De plus, les échantillons utilisés dans ce travail (**Tableau 16**) présentent des FP élevés par rapport aux échantillons utilisés par Sánchez et al. [173].

Les facteurs d'addition d'eau, de conservation, de méthode analytique, d'effet de l'échantillon de lait et leurs interactions ont contribué de manière significative à la variation observée du FP (**Tableau 19**). L'ajout d'eau a été le principal facteur affectant le FP. Les valeurs moyennes du FP varient de -528 à -466m°C pour des échantillons contenant 0 et 7% d'eau, avec une augmentation de 6m°C pour chaque point de pourcentage.

Les résultats obtenus sont cohérents avec les estimations mathématiques effectuées pour le lait de chèvre [177] et permettent de détecter une addition d'eau frauduleuse. D'où l'intérêt de ce paramètre pour la surveillance des systèmes de traite et de nettoyage, tout en tenant compte du fait que les systèmes de traite automatiques augmentent le FP du lait de vache [178,179]. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Pomiès et Bony (2000) qui n'ont pas détecté de différences entre les exploitations utilisant une salle de traite conventionnelle et un robot de traite [180].

Les effets des différentes stratégies de conservation étudiées sur le FP étaient différents ($p < 0,001$). Les plus petites différences ont été enregistrées avec les échantillons WPR, BCR20 et BCR40.

Les résultats les plus fiables ont été enregistrés avec les échantillons de BCR20. Les FP inférieurs des échantillons conservés s'expliquent par les modifications de l'équilibre osmotique du lait dues à l'augmentation des constituants hydrosolubles des échantillons. Cet effet est similaire dans les deux méthodes analytiques (**Tableau 20**). Les différences entre les deux méthodes sont liées aux modifications de la conductivité électrique du lait. En effet, la mesure du FP de lait par Milkoscan FT2 est réalisée par un conductimètre intégré au circuit de pompage du lait lors de l'analyse.

Tableau 16 - Moyennes des moindres carrés du point de congélation (m°C) et des écarts-types de répétabilité (Sr et Sr%) pour chacune des 40 conditions analytiques examinées avec les méthodes instrumentales (IM) et de référence (RM).

Condition Analytique ¹	RM ² LSM ⁴ (m°C)	IM ³ LSM ⁴ (m°C)	P	RM Sr (m°C)	RM Sr (%)	IM Sr (m°C)	IM Sr (%)
0-WPR	-518	-516	<0.001	1.26	0.24	1.63	0.32
0-BCR20	-521	-519	<0.001	1.52	0.29	1.53	0.29
0-BCR40	-523	-521	<0.001	0.96	0.18	1.31	0.25
0-PER20	-518	-521	<0.001	0.88	0.17	1.25	0.24
0-PER40	-520	-525	<0.001	1.23	0.24	1.15	0.22
1-WPR	-512	-510	<0.001	0.85	0.17	1.12	0.22
1-BCR20	-515	-513	<0.001	1.57	0.31	1.07	0.21
1-BCR40	-517	-513	NS	1.36	0.26	1.17	0.23
1-PER20	-512	-514	<0.05	0.89	0.17	1.29	0.25
1-PER40	-514	-518	<0.001	0.93	0.18	1.50	0.29
2-WPR	-506	-507	<0.001	1.49	0.29	1.33	0.26
2-BCR20	-510	-507	<0.001	1.60	0.31	1.18	0.23
2-BCR40	-511	-508	<0.001	1.59	0.31	1.10	0.22
2-PER20	-508	-512	<0.001	0.94	0.19	1.51	0.29
2-PER40	-509	-514	<0.001	1.48	0.29	1.08	0.21
3-WPR	-501	-500	<0.01	1.52	0.30	1.55	0.31
3-BCR20	-503	-501	NS	1.49	0.30	1.53	0.31
3-BCR40	-505	-502	<0.001	0.95	0.19	1.60	0.32
3-PER20	-501	-503	<0.001	1.13	0.23	1.39	0.28
3-PER40	-503	-508	<0.001	1.32	0.26	1.06	0.21
4-WPR	-495	-493	<0.001	1.25	0.25	1.45	0.29
4-BCR20	-498	-496	<0.001	0.98	0.20	1.53	0.31
4-BCR40	-499	-496	<0.001	0.89	0.18	1.06	0.21
4-PER20	-494	-499	<0.001	0.86	0.17	1.68	0.34
4-PER40	-497	-503	NS	0.89	0.18	1.48	0.29
5-WPR	-489	-488	<0.001	1.35	0.28	1.43	0.29
5-BCR20	-492	-492	<0.001	0.85	0.17	1.03	0.21
5-BCR40	-493	-491	<0.001	1.30	0.26	0.87	0.18
5-PER20	-489	-492	<0.001	1.71	0.35	0.82	0.17
5-PER40	-491	-501	<0.001	1.42	0.29	0.72	0.14
6-WPR	-482	-484	<0.01	1.63	0.34	1.03	0.21
6-BCR20	-487	-486	NS	0.97	0.20	1.53	0.31
6-BCR40	-489	-487	NS	1.23	0.25	1.04	0.21
6-PER20	-484	-489	<0.001	1.49	0.31	1.16	0.24
6-PER40	-485	-490	<0.001	0.84	0.17	1.48	0.30
7-WPR	-476	-477	<0.001	0.99	0.21	1.67	0.35
7-BCR20	-480	-478	<0.001	1.48	0.31	1.35	0.28

7-BCR40	-481	-480	<0.001	1.13	0.23	1.66	0.35
7-PER20	-477	-486	<0.001	0.98	0.21	1.09	0.22
7-PER40	-480	-486	NS	0.83	0.17	1.01	0.21

¹10 – 7 = pourcentage d'eau ajoutée (volume total); WPR=sans agent de conservation; BCR20=dichromate de potassium avec 20 µL de dichromate de potassium 1%/100 mL; BCR40=dichromate de potassium avec 40 µL de dichromate de potassium 1%/100 mL; PER20=peroxyde avec 20 µL/100 mL; PER40=peroxyde avec 40 µL/100 mL.

²Thermistance cryoscope (Advanced cryoscope, modèle 4D3, Advanced Instrument Inc., Norwood, MA).

³MilkoScan FT2 (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

⁴SE de LSM = 1,317 (erreur standard).

Tableau 17 - Coefficients de régression (b), d'interception (a) et de R² basés sur des analyses de régression pour des valeurs de point de congélation (m°C) obtenues par les méthodes de référence et de MilkoScan FT2 dans des conditions d'analyse différentes.

Condition analytique ¹	b	SE	a	SE	R ²
0-WPR	0.580***	0.096	-215.476***	49.763	0.612
0-BCR20	0.826***	0.046	-88.294**	23.912	0.933
0-BCR40	0.843***	0.076	-80.409 ^{NS}	39.450	0.844
0-PER20	1.002***	0.147	-2.052 ^{NS}	76.715	0.668
0-PER40	1.343***	0.162	174.240 ^{NS}	85.049	0.749
1-WPR	0.586***	0.059	-208.736***	29.962	0.812
1-BCR20	0.803***	0.043	-99.239***	21.924	0.939
1-BCR40	0.818***	0.045	-89.520***	23.244	0.934
1-PER20	0.960***	0.144	-22.655 ^{NS}	73.900	0.660
1-PER40	1.348***	0.090	176.838***	46.436	0.908
2-WPR	1.229***	0.151	115.063 ^{NS}	76.525	0.742
2-BCR20	0.887***	0.052	-53.889 ^{NS}	26.328	0.927
2-BCR40	0.704***	0.033	-147.849***	16.763	0.952
2-PER20	1.293***	0.125	145.883*	63.834	0.824
2-PER40	1.391***	0.151	195.917*	77.478	0.788
3-WPR	0.702***	0.047	-148.056***	23.685	0.905
3-BCR20	0.708***	0.070	-144.549***	35.271	0.815
3-BCR40	0.839***	0.034	-78.155***	16.998	0.964
3-PER20	1.033***	0.129	14.159 ^{NS}	65.149	0.735
3-PER40	1.384***	0.150	189.636*	76.226	0.787
4-WPR	0.541***	0.072	-224.975***	35.755	0.708
4-BCR20	0.775***	0.059	-110.070**	29.190	0.883
4-BCR40	0.589***	0.069	-201.384***	34.028	0.763
4-PER20	1.445***	0.178	216.873**	88.867	0.741
4-PER40	1.456***	0.168	223.220*	84.350	0.767
5-WPR	0.702***	0.035	-144.149***	17.165	0.945
5-BCR20	1.251***	0.139	123.264 ^{NS}	68.521	0.778
5-BCR40	0.573***	0.024	-207.069***	11.847	0.961
5-PER20	0.977***	0.176	-14.522 ^{NS}	86.620	0.573
5-PER40	1.773***	0.076	376.713***	38.293	0.959
6-WPR	1.251***	0.083	119.963**	39.931	0.909
6-BCR20	0.735***	0.032	-127.469***	15.415	0.959
6-BCR40	0.751***	0.066	-119.424**	32.129	0.849
6-PER20	1.372***	0.161	176.313*	78.537	0.760
6-PER40	1.235***	0.157	110.458 ^{NS}	76.954	0.729
7-WPR	1.255***	0.113	120.326*	54.021	0.843
7-BCR20	0.697***	0.049	-143.639***	23.402	0.898
7-BCR40	0.819***	0.042	-85.753***	20.180	0.943

7-PER20	1.525***	0.102	246.592***	49.421	0.907
7-PER40	1.585***	0.138	277.849***	66.980	0.852

¹10 – 7 = pourcentage d'eau ajoutée (volume total); WPR=sans agent de conservation; BCR20=dichromate de potassium avec 20 µL de dichromate de potassium 1%/100 mL; BCR40=dichromate de potassium avec 40 µL de dichromate de potassium 1%/100 mL; PER20=peroxyde avec 20 µL /100 mL; PER40=peroxyde avec 40 µL /100 mL.

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0001.

Tableau 18 - Composition des échantillons de lait du réservoir en vrac.

Paramètre	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Matière grasse (g/l)	25	31	41.1	38	2.29
Protéine (g/kg)	25	29	33	31	1.00
Extrait sec dégraissé DM (g/l)	25	89	95.4	92	1.63
FP ¹ (m°C)	25	-515	-528	-520	3.93
Lactose (g/l)	25	44	47.8	46	0.77

¹Méthode de référence.

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est l'agent de conservation traditionnel pour inhiber la croissance microbienne et la détérioration du lait. Un millilitre d'une solution à 23% d'H₂O₂ dans 300mL de lait cru permet de maintenir un nombre réduit de bactéries pendant 6 jours entre 8 et 10°C [181]. L'effet du peroxyde sur le lait étant lié à sa décomposition par les peroxydases présentes dans le lait cru, ces enzymes dégradent le peroxyde en libérant de l'oxygène atomique susceptible de provoquer certaines oxydations particulières (exemple : oxydation par la quinone de certains polyphénols avec formation de substances colorées). En plus de libérer de l'oxygène atomique, ces réactions libèrent de l'eau [182].

Tableau 19 - Analyse de la variance des variations du point de congélation.

Source de variation	df	F	Sig.
Eau ajoutée	7	113393,544	<.0001
Conservateur	4	5544,416	<.0001
Méthode d'analyse	1	1787,677	<.0001
Échantillon	24	9946,542	<.0001
Échantillon x Conservateur	96	44,099	<.0001
Échantillon x Eau ajoutée	168	8,066	<.0001
Échantillon x Méthode d'analyse	24	104,572	<.0001
Conservateur x Eau ajoutée	28	61,332	<.0001
Conservateur x Méthode d'analyse	4	4,461	<.001
Eau ajoutée x Méthode d'analyse	7	5,431	<.0001
Échantillon x Conservateur x Eau ajoutée	672	10,351	<.0001
Échantillon x Conservateur x Méthode d'analyse	96	0,888	NS
Échantillon x Eau ajoutée x Méthode d'analyse	168	1,375	<0.05
Conservateur x Eau ajoutée x Méthode d'analyse	28	6,915	<.0001

df: degré de liberté; F: rapport F; SIG.: Valeur de signification; NS: non significatif.

Les résultats montrent que, pour des raisons pratiques, les trois concentrations de BCR20, BCR40 et PER20 peuvent être utilisées dans la détermination du FP de lait de vache en utilisant les deux méthodes : méthode de référence et méthode de Milkoscan FT2. D'autre part, l'augmentation de la concentration en peroxyde (ajoutée directement aux échantillons de lait) entraîne des différences très importantes entre les deux méthodes de détermination du FP et conduit à une réduction significative du

FP. A concentration élevée, l'utilisation du peroxyde en tant qu'agent de conservation sera conditionnée par une correction de biais sur le Milkoscan FT2 avant la détermination de la FP. Ceci permet de limiter une mauvaise interprétation des valeurs de FP.

Tableau 20 - Les moindres carrés signifient le point de congélation en fonction de l'interaction de la méthode d'analyse et le conservateur.

Analytical Method	Preservative ³	LSM ⁴ FP (m°C)
Méthode de référence ¹	WPR	-497
	BCR20	-501
	BCR40	-502
	PER20	-498
	PER40	-500
Méthode instrumentale ²	WPR	-497
	BCR20	-499
	BCR40	-500
	PER20	-502
	PER40	-506

¹Thermistor cryscope (Advanced Cryoscope, model 4D3, Advanced Instrument Inc., Norwood, MA).

²Milkoscan FT2 (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

³WPR=sans agent de conservation ; BCR20=dichromate de potassium avec 20µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; BCR40=dichromate de potassium avec 40µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; PER20=peroxyde avec 20µL/100mL ; PER40 = peroxyde avec 40µL/100mL.

⁴SE de LSM = 0.466 (erreur standard).

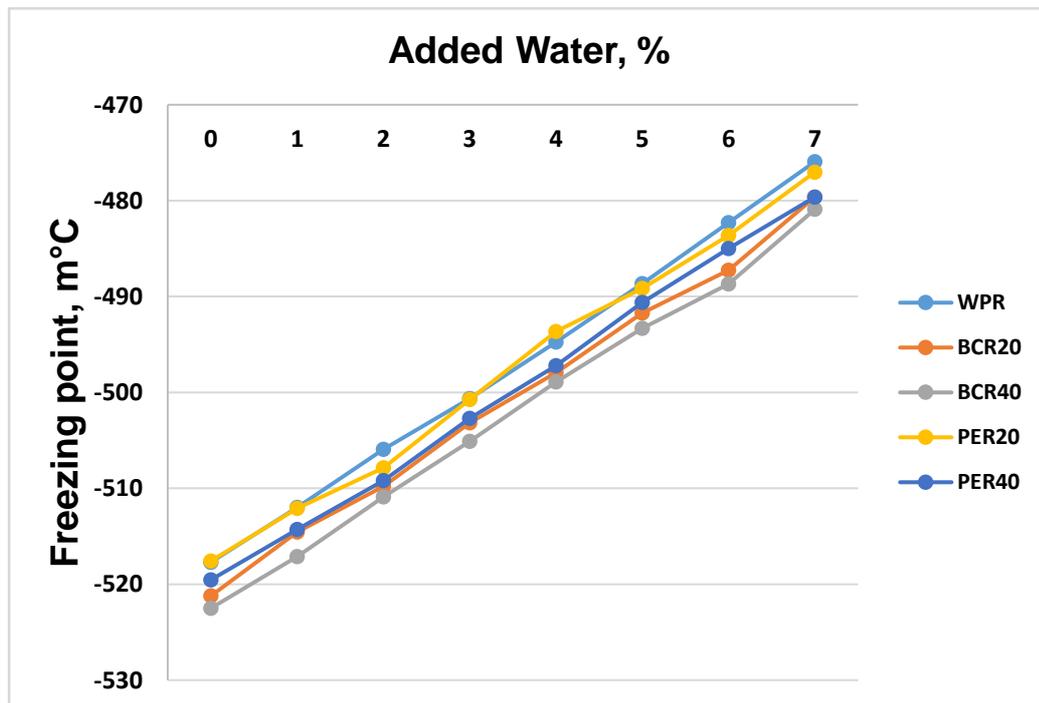


Figure 40 - Moindres carrés des points de congélation (milliCelsius) pour la méthode Milkoscan FT2 en fonction de l'interaction eau ajoutée et l'agent de conservation (WPR=Sans agent de conservation ; BCR20=Bichromate de potassium avec 20 µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; BCR40=Dichromate de potassium avec 40µL de dichromate de potassium 1%/100mL ; PER20=Peroxyde avec 20µL/100mL ; PER40 = Peroxyde avec 40µL/100mL).

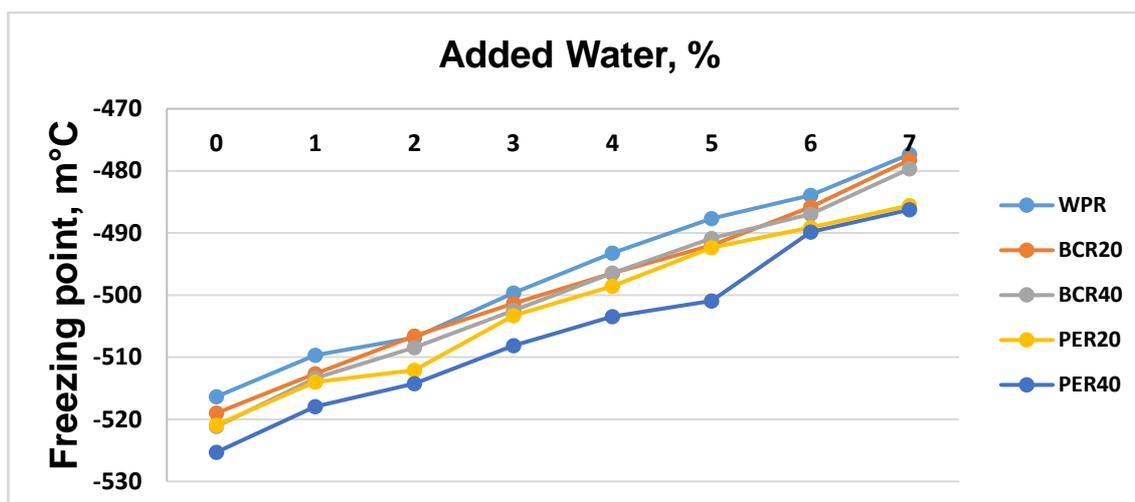


Figure 41 - Moindres carrés des points de congélation (milliCelsius) pour la méthode de référence en fonction de l'interaction eau ajoutée et l'agent de conservation (WPR=Sans agent de conservation ; BCR20=Bichromate de potassium avec 20 μ L de dichromate de potassium 1%/100mL ; BCR40=Dichromate de potassium avec 40 μ L de dichromate de potassium 1%/100mL ; PER20=Peroxyde avec 20 μ L/100mL ; PER40 = Peroxyde avec 40 μ L/100mL).

Pour les deux méthodes, les effets des deux agents de conservation n'étaient pas très similaires, avec des concentrations différentes d'eau ajoutées (**Figure 40 et Figure 41**). Par conséquent, le type de conservateur utilisé et sa concentration doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats du FP. Ceci afin d'éviter de considérer les échantillons conservés comme fraudés par l'ajout d'eau.

IV. Conclusion

La précision obtenue dans les différentes conditions d'analyse suggère que Milkoscan FT2 peut être utilisé pour la détermination du FP du lait de vache avec conservateur ajouté. Selon l'analyse de régression, la meilleure condition analytique pour la détermination du FP lorsque Milkoscan FT2 est utilisé implique la conservation des échantillons avec du bichromate de potassium (à 20 et 40 μ L de dichromate de potassium 1%/100mL) et du peroxyde (à 20 μ L/100mL). L'augmentation de la concentration en peroxyde conduit à des différences quelque peu éliminées entre les deux méthodes : méthode Milkoscan FT2 et cryoscopie à thermistance.

Pour chaque méthode de conservation utilisée, la détermination de la FP doit tenir compte du type de conservateur et de la concentration utilisée. En négligeant ces paramètres, l'interprétation des valeurs de FP peut être erronée en termes de teneur en eau.

CONCLUSION GENERALE

L'acte d'achat d'un produit laitier est justifié par ces valeurs nutritionnelles qui lui confère l'aptitude de répondre aux besoins de consommateurs en leur apportant tous les éléments nutritifs nécessaires et prévus. Ces valeurs peuvent être compromises par des manipulations frauduleuses qui peuvent parfois nuire à la santé. Afin de protéger les consommateurs de ces risques et palier une économie basée sur un commerce déloyal, les contrôleurs doivent utiliser des moyens rapides et efficaces pour lutter contre ces pratiques.

Le lait est un système très complexe, où l'interaction des constituants présents avec les rayonnements infrarouges, peut fournir une multitude d'informations utiles à la fois pour son authentification et la quantification de ces constituants. L'apport des méthodes chimiométriques est très considérable dans le processus d'extraction de ces informations. Ainsi, l'association des méthodes chimiométriques et la spectroscopie infrarouge peut fournir une alternative efficace et prometteuse par rapport aux méthodes d'analyses classiques. Une alternative qui réduit le temps, le coût et qui respecte l'environnement, ce qui inscrit la méthode dans une démarche développement durable.

Pour le cas de la fraude du lait de chamelle par le lait de vache, l'application de l'ACP sur les spectres de la gamme d'étalonnage a permis de distinguer quatre groupes d'échantillons avec des concentrations ascendantes en lait de vache. L'exploitation de la courbe de chargement de la première PC, l'ACP a permis d'associer cette fraude aux changements enregistrés au niveau des longueurs d'ondes spécifiques pour la matière grasse, les protéines et le lactose. L'ACP été exploitée pour déterminer les facteurs de discrimination entre les échantillons de chamelle fraudés avec le lait de vache. Et ce avant d'entamer la calibration de modèles capables de quantifier le pourcentage de lait de vache ajouté.

La spectroscopie MIR-TF couplée à la régression PLS a permis de détecter et quantifier cette fraude. Les résultats des tests des prétraitements mathématiques des spectres ont montré que les modèles PLS, sans prétraitement ou avec centrage par moyenne, montrent une puissance prédictive élevée. La validation externe de ces modèles, avec des échantillons non compris dans la gamme d'étalonnage, a donné un R-square de 0.994, un RMSEP de 0.8654, une LOD de 2.595% et une erreur relative de 3.8%. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le modèle PLS avec le centrage par moyenne. Dans l'ensemble, la performance des modèles multivariés est très prometteuse et pourrait être considérée comme une méthode efficace pour détecter une faible quantité d'adultération du lait de chamelle par le lait de vache.

La spectroscopie MIR-TF couplée à la PLS est appliquée aussi pour déterminer quantitativement le saccharose ajouté au lait. L'application analytique développée nous a permis d'établir un modèle prédictif, capable de détecter l'adultération du lait par ajout du saccharose. Le prétraitement de la gamme spectrale, comprise entre 1800 et 920cm⁻¹ avec la première dérivée de Savitzky-Golay, a permis aux modèles basés sur la régression PLS de détecter et quantifier le

saccharose ajouté au lait de vache. Les bonnes performances prédictives du modèle développé ont permis d'avoir des erreurs relatives de $5,167 \pm 0,586$ g/l et une limite de détection de $1,31 \pm 0,052$ g/l. Cette étude montre que la spectroscopie FT-MIR couplée à la PLS, est une méthode adéquate pour l'analyse de la quantification de saccharose ajouté dans le lait cru sans prétraitement ou manipulation des échantillons.

En effet, les activités menées au cours de ce travail nous ont permis de présenter les méthodes et les traitements applicables aux spectres de MIR-TF. Les prétraitements adéquats peuvent extraire les informations recherchées dans le grand nombre de variables contenues dans les spectres des échantillons analysés. Leur application aux spectres du lait de chamelle fraudée avec le lait de vache n'était pas d'une grande utilité, mais pour le cas de la fraude de lait de vache par le saccharose, ils améliorent considérablement les performances de la régression PLS.

Dans le but d'étudier la performance des équipements, basés sur la spectroscopie IR-TF, un analyseur du lait a été testé pour différentes conditions analytiques. Cet équipement offre une grande cadence et permet de réaliser des programmes de contrôle de qualité et de paiement du lait. Ces programmes impliquent un grand nombre d'échantillons et les contrôleurs ont recours aux conservateurs pour préserver les qualités des échantillons prélevés. En variant le pourcentage d'eau ajouté et les stratégies de conservation, la mesure du point de congélation par la méthode officielle et l'analyseur rapide du lait, a confirmé la performance des équipement basés sur la spectroscopie IR-TF et a montré que même avec de conservateurs ces équipements sont capables de fournir des résultats rapides, non-destructifs et interprétables.

Ces travaux prouvent que la spectroscopie infrarouge couplée aux méthodes chimiométriques peut servir à développer des méthodes rapides pour contrôler la qualité du lait et son authentification. Ces méthodes sont utiles pour pouvoir décider rapidement sur le devenir des produits analysés. Ces méthodes peuvent aussi être intégrées comme analyse de routine, et être adaptées aux applications en ligne dans les process industriels. Ainsi, elles peuvent remplacer les méthodes chimiques qui nécessitent le recours aux produits chimiques onéreux et une main d'œuvre qualifiée.

Les résultats des travaux réalisés donnent beaucoup de perspectives dans la détermination rapide de l'authenticité et la quantification des constituants du lait. D'autres études sont envisageables sur la détection d'autres fraudes, en relation avec la rupture de la chaîne du froid, surtout pour les régions qui connaissent de longues périodes de fortes chaleurs. Une autre étude est envisageable pour la discrimination entre les laits qui peuvent résister aux traitements thermiques qui dépassent les 100°C et ainsi distinguer entre les laits qui peuvent être utilisés pour la production des produits UHT et les produits pasteurisés. Cette stabilité thermique et un indicateur de fraîcheur pour le lait et fait partie des critères de paiement du lait.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. Lees, Food authenticity: issues and methodologies, Eurofins Scientific, 1999.
- [2] M. Cuny, Food authentication by Proton NMR spectroscopy in combination with chemometric tools, AgroParisTech, 2008. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003745>.
- [3] R. Combaldieu, La fraude en matière alimentaire, *Rev. Int. Droit Comparé*. 26 (1974) 515–527.
- [4] Décret n°2-12-389 du 11 Joumada II 1434 (22 avril 2013) fixant les conditions et les modalités d'étiquetage des produits alimentaires, BO n°6152, 2013.
- [5] M.J. Dennis, Recent developments in food authentication, *Analyst*. 123 (1998) 151R-156R. <https://doi.org/10.1039/a802892c>.
- [6] F. Ulberth, 16 - Milk and dairy products A2 - Lees, Michèle BT - Food Authenticity and Traceability, in: Woodhead Publ. Ser. Food Sci. Technol. Nutr., Woodhead Publishing, 2003: pp. 357–377. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9781855737181.2.357>.
- [7] D. Bertrand, E. Dufour, La spectroscopie proche infrarouge et ses applications analytiques, in: Collect. Sci. Technol. Agroaliment. Tec Doc, Lavoisier, Paris, 2006: pp. 566–570.
- [8] R.H. Wilson, Spectroscopic techniques for food analysis, New York, 1994. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000350299>.
- [9] J.-M. Romnée, Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait, Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 2009.
- [10] R. Tsenkova, S. Atanassova, K. Itoh, Y. Ozaki, K. Toyoda, Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers., *J. Anim. Sci.* 78 (2000) 515–522. <https://doi.org/10.2527/2000.783515x>.
- [11] S. Kawamura, M. Kawasaki, H. Nakatsuji, M. Natsuga, Near-infrared spectroscopic sensing system for online monitoring of milk quality during milking, *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 1 (2007) 37–43. <https://doi.org/10.1007/s11694-006-9001-x>.
- [12] AOAC, Fat, Lactose, Protein, and Solids in milk. Mid-infrared spectroscopic method, AOAC 972.16-1972, 1996.
- [13] N. Koca, N.A. Kocaoglu-Vurma, W.J. Harper, L.E. Rodriguez-Saona, Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration, *Food Chem.* 121 (2010) 778–782. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.083>.
- [14] C. Lu, B. Xiang, G. Hao, J. Xu, Z. Wang, C. Chen, Rapid detection of melamine in milk powder by near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.* 17 (2009) 59–67. <https://doi.org/10.1255/jnirs.829>.
- [15] J.M. Steijns, Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix?, *Int. Dairy J.* 18 (2008) 425–435. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.008>.
- [16] A. Drewnowski, Concept of a nutritious food: toward a nutrient density score., *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (2005) 721–732. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210699> (accessed March 15, 2017).
- [17] T. Mitsui, N. Kasezawa, T. Goda, F.A. Muskiet, A. Cats, E.T. Oremus, E. Al., Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults, *Nutr. Res.* 27 (2007) 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.05.006>.
- [18] J.M. Steijns, Milk ingredients as nutraceuticals, *Int. J. Dairy Technol.* 54 (2001) 81–88. <https://doi.org/10.1046/j.1364-727x.2001.00019.x>.
- [19] A.A. El Mekki, Chapitre 11-La filière lait et les produits laitiers au Maroc, *Annuaire*. (2007) 291–311.
- [20] F. Courtet Leymarios, Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation, LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL, 2010.
- [21] A. Araba, S. Benjelloun, A. Hamama, R. Hamimaz, M. Zahar, Organisation de la filière laitière au Maroc, *Options Mediterr. Ser. B.* 32 (2001) 47–62.
- [22] FAO, FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture, FAO Stat. Yearb. 2013 World Food Agric. (2013) 1–307. <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>.
- [23] M. Sraïri, A. Cholin Kuper, Conséquences de la libéralisation des marchés sur les opérateurs de la filière laitière au Maroc, *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 60 (2007) 177–187.
- [24] Y. CHATELAIN, J. ALOUI, D. GUGGISBERG, J.O. BOSSET, La couleur du lait et des produits laitiers et sa mesure: un article de synthèse (1972-2002), *Mitteilungen aus Leb. und Hyg.* 94 (2003) 461–488. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=15291197> (accessed October 1, 2016).
- [25] J.-B. COULON, A. PRIOLO, La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux, *Prod. Anim.* 15 (2002) 333–342. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=14411791> (accessed October 1, 2016).
- [26] C. Lapointe-Vignola, Science et technologie du lait: transformation du lait, Presses inter Polytechnique,

- 2002.
- [27] L. MARTELLI, P. NAVELLIER, Lactodensimètre de précision. étude et réalisation, *Lait*. 42 (1962) 134–152. <https://doi.org/10.1051/lait:1962413-4146>.
- [28] D. Chavannes, P. Demont, *Contrôle du lait et des principaux produits laitiers: cours donné ...*, F. Rouge & Cie, 1945.
- [29] J.B. Coulon, Y. Chilliard, B. Rémond, Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques (aptitude à la coagulation, lipolyse), *INRA Prod. Anim.* 4 (1991) 219–228. <https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/895941/filename/hal-00895941.pdf>.
- [30] G. Meurant, *Handbook of milk composition*, Academic press, 1995.
- [31] H. Pointurier, *La gestion matières dans l'industrie laitière*, Éditions Tec & Doc, 2003.
- [32] J. Amiot, S. Fournier, Y. Lebeuf, P. Paquin, R. Simpson, Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait, in: *Sci. Technol. Du Lait Transform. Du Lait*. Press. Int. Polytech. Montréal, Presses inter Polytechnique, 2002.
- [33] P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer, 1998.
- [34] A. Tapernoux, R. Vuillaume, Viscosité du lait de vache, *Lait*. 14 (1934) 449–456.
- [35] T. Croguennec, R. Jeantet, G. Brulé, *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*, Editions Lavoisier TEC et DOC, 2008. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01123279>.
- [36] O.R. Fennema, *Food Chemistry, Third Edition*, Taylor & Francis, 1996. <https://books.google.co.ma/books?id=88CaKDI6lnwC>.
- [37] R. Jeantet, T. Croguennec, M. Mahaut, P. Schuck, G. Brulé, *Les produits laitiers*, Lavoisier TEC & DOC, 2008. <https://hal-agrocampus-ouest.archives-ouvertes.fr/hal-00729759>.
- [38] R. Jenness, N.P. Wong, E.H. Marth, M. Keeney, *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Springer, 1988.
- [39] K. Raynal-Ljutovac, J. Bouvier, C. Gayet, N. Simon, F. Joffre, F. Fine, J.-L. Vendevre, C. Lopez, J.-M. Chardigny, M.-C. Michalski, C. Genot, Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme, *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 18 (2011) 324–351. <https://doi.org/10.1051/ocl.2011.0415>.
- [40] Fao, *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine*, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 1995. <https://books.google.co.ma/books?id=4zNuqZpwNw4C>.
- [41] M.W. Taylor, A.K.H. MacGibbon, LIPIDS | Fatty Acids, in: *Encycl. Dairy Sci.*, Elsevier, 2002: pp. 1550–1554. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00260-1>.
- [42] H. Roginski, M.W. Taylor, A.K.H. MacGibbon, LIPIDS | Triacylglycerols, in: *Encycl. Dairy Sci.*, 2002: pp. 1555–1559. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00261-3>.
- [43] P.H. Cayot, D. Lorient, *Structures et technofonctions des protéines du lait*, Arilait Recherches; Tec&Doc-Lavoisier, 1998.
- [44] R. Grappin, D. Dupont, S. Pochet, D. Lefier, MILK PROTEINS | Analytical Methods, in: *Encycl. Dairy Sci.*, 2002: pp. 1967–1976. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00329-1>.
- [45] B. Ribadeau-Dumas, Structure and Variability of Milk Proteins, in: C.A. Barth, E. Schlimme (Eds.), *Milk Proteins Nutr. Clin. Funct. Technol. Asp.*, Steinkopff, Heidelberg, 1989: pp. 112–123. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85373-9_17.
- [46] P. Walstra, J.T.M. Wouters, T.J. Geurts, *Dairy Science and Technology*, Second Edition, CRC, 92, , 2005.
- [47] J.A. O'Mahony, P.F. Fox, Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects, in: P.L.H. McSweeney, P.F. Fox (Eds.), *Adv. Dairy Chem. Vol. 1A Proteins Basic Asp. 4th Ed.*, Springer US, Boston, MA, 2013: pp. 43–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2.
- [48] L.M.L. Nollet, F. Toldra, *Handbook of Dairy Foods Analysis*, CRC Press, 2009.
- [49] D.D. Muir, A.W.M. Sweetsur, The influence of naturally occurring levels of urea on the heat stability of bulk milk, *J. Dairy Res.* 43 (1976) 495. <https://doi.org/10.1017/S0022029900016083>.
- [50] R. Veisseyre, *Technologie du lait: constitution, recolte, traitement et transformation du lait* 3, (1975).
- [51] P.A. Morrissey, Lactose: Chemical and Physicochemical Properties, in: P.F. Fox (Ed.), *Dev. Dairy Chem. Lact. Minor Const.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1985: pp. 1–34. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4950-8_1.
- [52] P.F. Fox, Lactose and Oligosaccharides | Lactose: Chemistry, Properties, *Encycl. Dairy Sci.* (2011) 173–181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00273-9>.
- [53] Y.H. Hui, R.C. Chandan, S. Clark, N.A. Cross, J.C. Dobbs, W.J. Hurst, L.M.L. Nollet, E. Shimoni, N. Sinha, E.B. Smith, others, *Handbook of Food Products Manufacturing, 2 Volume Set*, Wiley, 2007.
- [54] J. MASEK, Contribution à la connaissance de la composition chimique de la boue d'écrèmeuse, *Lait*. 15 (1935) 242–247. <https://doi.org/10.1051/lait:193514310>.
- [55] M.R. García-Risco, M. Villamiel, R. López-Fandiño, Effect of homogenisation on protein distribution and

- proteolysis during storage of indirectly heated UHT milk, *Lait*. 82 (2002) 589–599. <https://doi.org/10.1051/lait:2002035>.
- [56] W. DORNER, A. WIDMER, Rancissement du lait par l'homogénéisation, *Lait*. 11 (1931) 545–564. <https://doi.org/10.1051/lait:193110622>.
- [57] H. Singh, Interactions of milk proteins during the manufacture of milk powders, *Lait*. 87 (2007) 413–423. <https://doi.org/10.1051/lait:2007014>.
- [58] D. Bertrand, É. Dufour, *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Tec & Doc, Paris, 2000. <https://books.google.co.ma/books?id=FyuVAAAACAAJ>.
- [59] A. Rogalski, Infrared detectors: an overview, *Infrared Phys. Technol.* 43 (2002) 187–210. [https://doi.org/10.1016/S1350-4495\(02\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S1350-4495(02)00140-8).
- [60] A. Rogalski, History of infrared detectors, *Opto-Electronics Rev.* 20 (2012) 279–308. <https://doi.org/10.2478/s11772-012-0037-7>.
- [61] G. Reich, Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1109–1143. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.020>.
- [62] D. Bertrand, É. Dufour, *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 2006. <https://books.google.co.ma/books?id=YkBjmgEACAAJ>.
- [63] R. Francis, R. Annick, C. Daniel, *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales*, 4ème Ed, Dunod, Paris, 2004.
- [64] C.N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill, 1983.
- [65] J.J. Workman, NIR spectroscopy calibration basics, *Pract. Spectrosc. Ser.* 13 (1992) 247.
- [66] M. Essendoubi, *Identification et typage par (micro) spectroscopie IRTF des levures du genre Candida d'origine clinique*, Reims, 2007.
- [67] M. Dalibart, *Spectroscopie Dans l'infrarouge*, Ed. Techniques Ingénieur, 2000.
- [68] T. Sato, Application of principal-component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable oils for their classification, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 293–298. <https://doi.org/10.1007/BF02638055>.
- [69] M. Defernez, E.K. Kemsley, R.H. Wilson, Use of Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Fruit Purees, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 109–113. <https://doi.org/10.1021/jf00049a021>.
- [70] M. Defernez, R.H. Wilson, Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for determining the type of fruit used in jam, *J. Sci. Food Agric.* 67 (1995) 461–467. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670407>.
- [71] R. Briandet, E.K. Kemsley, R.H. Wilson, Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 170–174. <https://doi.org/10.1021/jf950305a>.
- [72] E.K. Kemsley, S. Ruault, R.H. Wilson, Discrimination between Coffea arabica and Coffea canephora variant robusta beans using infrared spectroscopy, *Food Chem.* 54 (1995) 321–326. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00030-M](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00030-M).
- [73] A. Szydłowska-Czerniak, MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process, *Food Chem.* 105 (2007) 1179–1187. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.038>.
- [74] J. Keirse, *Spectroscopie infrarouge déportée: mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique*, Université Rennes 1, 2003.
- [75] B. Smith, *Infrared spectral interpretation: A systematic approach* CRC press, Boca Rat. (1999).
- [76] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principes d'analyse instrumentale*, De Boeck, 2003. <https://books.google.co.ma/books?id=HVhZniM-BF8C>.
- [77] R.M. Balabin, S. V. Smirnov, Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder, *Talanta*. 85 (2011) 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.026>.
- [78] Y. Etzion, R. Linker, U. Cogan, I. Shmulevich, Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2779–2788. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0).
- [79] Y. ROGGO, *Sugar beet quality determination by near infrared spectroscopy and chemometric*, Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2003. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006113>.
- [80] V. Bellon-Maurel, *Application de la spectroscopie proche infrarouge au contrôle en ligne de la qualité des fruits et légumes*, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1992.
- [81] G. Kloos, Design of a Michelson interferometer for the measurement of electrostrictive strains, *Opt. Laser Technol.* 28 (1996) 481–484. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-3992\(96\)00007-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-3992(96)00007-2).
- [82] J. Zhang, J.Q. Xu, C.Y. Gao, S.C. Si, Modified Michelson interferometer for probing refractive index of birefringent crystal CSBN50, *Opt. Lasers Eng.* 47 (2009) 1212–1215.

- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.optlaseng.2009.05.016>.
- [83] E. V Loewenstein, The History and Current Status of Fourier Transform Spectroscopy, *Appl. Opt.* 5 (1966) 845–854. <https://doi.org/10.1364/AO.5.000845>.
- [84] P. Fellgett, I. — les principes généraux des méthodes nouvelles en spectroscopie interférentielle - A propos de la théorie du spectromètre interférentiel multiplex, *J. Phys. Le Radium.* 19 (1958) 187–191. <https://doi.org/10.1051/jphysrad:01958001903018700>.
- [85] P. Jacquinet, Caractères communs aux nouvelles méthodes de spectroscopie interférentielle ; Facteur de mérite, *J. Phys. Le Radium.* 19 (1958) 223–229. <https://doi.org/10.1051/jphysrad:01958001903022300>.
- [86] G. Guelachvili, Near infrared wide-band spectroscopy with 27-MHz resolution, *Appl. Opt.* 16 (1977) 2097–2101. <https://doi.org/10.1364/AO.16.002097>.
- [87] J.U. White, Very long optical paths in air, *J. Opt. Soc. Am.* 66 (1976) 411–416. <https://doi.org/10.1364/JOSA.66.000411>.
- [88] M.-F. Mérienne, A. Jenouvrier, C. Hermans, A.C. Vandaele, M. Carleer, C. Clerbaux, P.-F. Coheur, R. Colin, S. Fally, M. Bach, Water vapor line parameters in the 13 000–9250 cm⁻¹ region, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 82 (2003) 99–117. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-4073\(03\)00148-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-4073(03)00148-1).
- [89] S.N. Mikhailenko, V.L.G. Tyuterev, V.I. Starikov, K.K. Albert, B.P. Winnewisser, M. Winnewisser, G. Mellau, C. Camy-Peyret, R. Lanquetin, J.-M. Flaud, J.W. Brault, Water Spectra in the Region 4200–6250 cm⁻¹, Extended Analysis of $\nu_1+\nu_2$, $\nu_2+\nu_3$, and $3\nu_2$ Bands and Confirmation of Highly Excited States from Flame Spectra and from Atmospheric Long-Path Observations, *J. Mol. Spectrosc.* 213 (2002) 91–121. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/jmsp.2002.8558>.
- [90] N.J. Harrick, *Internal reflection spectroscopy*, John Wiley and Sons, 1967.
- [91] W. Mc Clure, Near infrared spectroscopy, in: R.H. Wilson (Ed.), *Spectrosc. Tech. Food Anal.*, VCH Publisher, 1994: pp. 13–57.
- [92] M. Snieder, W.G. Hansen, Crystal Effect on Penetration Depth in Attenuated Total Reflectance Fourier-transform Infrared Study of Human Skin, in: J. Mink, G. Keresztury, R. Kellner (Eds.), *Prog. Fourier Transform Spectrosc. Proc. 10th Int. Conf. August 27 -- Sept. 1, 1995, Budapest, Hungary*, Springer Vienna, Vienna, 1997: pp. 677–678. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6840-0_175.
- [93] D.L. Massart, B.G. Vandeginste, L.M.C. Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, S. De Jong, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier Science Inc., New York, NY, USA, 1997.
- [94] D. Bertrand, Les méthodes d'analyse rapide dans les industries agroalimentaires, in: *La Spectrosc. Infrarouge Ses Appl. Anal.*, Paris: Lavoisier, 2006: pp. 4–28.
- [95] G. Jacques, *La méthode des plans d'expériences*, Dunod, Paris, 1996.
- [96] I.T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, Springer New York, New York, NY, 1986. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1904-8>.
- [97] M. Tenenhaus, L'approche PLS, *Rev. Stat. Appliqu{e}*. 47 (1999) 5–40.
- [98] M. Bardos, *Analyse discriminante: application au risque et scoring financier*, Dunod, 2001.
- [99] M. Dhanoa, S. Lister, R. Sanderson, R. Barnes, The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra, *J. Near Infrared Spectrosc.* 2 (1994) 43–47. <https://doi.org/10.1255/jnirs.30>.
- [100] B. Igne, J.-M. Roger, S. Roussel, V. Bellon-Maurel, C.R. Hurburgh, Improving the transfer of near infrared prediction models by orthogonal methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 99 (2009) 57–65. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.07.007>.
- [101] A. Savitzky, M.J.E. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures., *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- [102] Y. Roggo, Détermination de la qualité de la betterave sucrière par spectroscopie proche infrarouge et chimiométrie, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I, 2003.
- [103] M. Otto, *Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry; Chemometrics*, (1999).
- [104] M. Danzart, *Statistique descriptive, SSHA&ISHA, Anal. Sensorielle. Man. Méthodologique, Tec&Doc*, Paris. (1990) 209.
- [105] L. Eriksson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, Multi-and megavariate data analysis: Part I: basic principles and applications, (2006).
- [106] D. Bertrand, Les méthodes d'analyse rapide dans les industries agroalimentaires, *La Spectrosc. Infrarouge Ses Appl. Anal.* (2006) 4–28.
- [107] R.K. Blashfield, M.S. Aldenderfer, The Methods and Problems of Cluster Analysis, in: J.R. Nesselrode, R.B. Cattell (Eds.), *Handb. Multivar. Exp. Psychol.*, Springer US, Boston, MA, 1988: pp. 447–473. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0893-5_14.
- [108] A.J. Kos, C. Psenicka, Measuring Cluster Similarity across Methods, *Psychol. Rep.* 86 (2000) 858–862. <https://doi.org/10.2466/pr0.2000.86.3.858>.

- [109] B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Chapter 30 - Cluster analysis, in: D.L.M. B.G.M. Vandeginste L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke BT - Data Handling in Science and Technology (Ed.), Handb. Chemom. Qualimetrics Part B, Elsevier, 1998: pp. 57–86. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-3487\(98\)80040-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-3487(98)80040-3).
- [110] K. Le Mapihan, Caractérisation et classification des phases stationnaires utilisées pour l'analyse CPL de produits pharmaceutiques, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00000908>.
- [111] H. Wold, others, Estimation of principal components and related models by iterative least squares, *Multivar. Anal.* 1 (1966) 391–420.
- [112] S. Wold, J. Trygg, A. Berglund, H. Antti, Some recent developments in PLS modeling, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 131–150. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00156-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00156-3).
- [113] E. Vigneau, E.M. Qannari, Clustering of variables around latent components, *Commun. Stat. Comput.* 32 (2003) 1131–1150.
- [114] M. Tenenhaus, La régression PLS: théorie et pratique, Editions Technip, 1998. <https://books.google.fr/books?id=OesjK2KZhsAC>.
- [115] A. Höskuldsson, PLS regression methods, *J. Chemom.* 2 (1988) 211–228. <https://doi.org/10.1002/cem.1180020306>.
- [116] P. Geladi, S. Wold, K. Esbensen, Image analysis and chemical information in images, *Anal. Chim. Acta.* 191 (1986) 473–480. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86335-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86335-7).
- [117] C. Pizarro, S. Rodríguez-Tecedor, N. Pérez-del-Notario, I. Esteban-Díez, J.M. González-Sáiz, Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors, *Food Chem.* 138 (2013) 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.087>.
- [118] C. Fraley, A.E. Raftery, Model-Based Clustering, Discriminant Analysis, and Density Estimation, *J. Am. Stat. Assoc.* 97 (2002) 611–631. <https://doi.org/10.1198/016214502760047131>.
- [119] D. Steele, Multivariate calibration, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 46 (1990) 1541. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(90\)80069-B](https://doi.org/10.1016/0584-8539(90)80069-B).
- [120] A.M.C. Davies, Cross-validation: do we love it too much?, *Spectrosc. Eur.* 10 (1998) 24–25.
- [121] A. Golbraikh, A. Tropsha, Beware of q^2 !, *J. Mol. Graph. Model.* 20 (2002) 269–276. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(01\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(01)00123-1).
- [122] A.T. and A. Golbraikh, Predictive QSAR Modeling Workflow, Model Applicability Domains, and Virtual Screening, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 3494–3504. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/138161207782794257>.
- [123] M. Dekker, J.J. Workman, D.A. Burns, E.W. Ciurczak, NIR spectroscopy calibration basics, in: *Handb. Near Infrared Anal.*, Ed, New York, 1992: pp. 247–280.
- [124] M. Cuny, Authenticité des produits agroalimentaires par spectroscopie RMN 1H et outils chimiométriques, 2008.
- [125] L. Xu, C.B. Cai, H.F. Cui, Z.H. Ye, X.P. Yu, Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics, *Meat Sci.* 92 (2012) 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.019>.
- [126] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.023>.
- [127] B. Valenti, B. Martin, D. Andueza, C. Leroux, C. Labonne, F. Lahalle, H. Larroque, P. Brunschwig, C. Lecomte, M. Brochard, A. Ferlay, Infrared spectroscopic methods for the discrimination of cows' milk according to the feeding system, cow breed and altitude of the dairy farm, *Int. Dairy J.* 32 (2013) 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.014>.
- [128] Y. Etzion, R. Linker, U. Cogan, I. Shmulevich, Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2779–2788. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0).
- [129] M. Ferrand, B. Huquet, S. Barbey, F. Barillet, F. Faucon, H. Larroque, O. Leray, J.M. Trommenschlager, M. Brochard, Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 106 (2011) 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.05.004>.
- [130] S. Jawaid, F.N. Talpur, S.T.H. Sherazi, S.M. Nizamani, A.A. Khaskheli, Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Chem.* 141 (2013) 3066–3071. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106>.
- [131] S. YUAN, Y. HE, T. MA, D. WU, P. NIE, Fast Determination of Melamine Content in Milk Base on Vis/NIR Spectroscopy Method, *Spectrosc. Spectr. Anal.* 29 (2009).

- [132] Y. DONG, Z. TU, D. ZHU, Y. LIU, Y. WANG, J. HUANG, B. SUN, Z. FAN, Feasibility of Using NIR Spectroscopy to Detect Melamine in Milk, *Spectrosc. Spectr. Anal.* 29 (2009).
- [133] A. Oussama, F. Elabadi, O. Devos, Analysis of Argan Oil Adulteration Using Infrared Spectroscopy, *Spectrosc. Lett.* 45 (2012) 458–463. <https://doi.org/10.1080/00387010.2011.639121>.
- [134] G. Gurdeniz, B. Ozen, Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data, *Food Chem.* 116 (2009) 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.068>.
- [135] M. De Luca, W. Terouzi, G. Ioele, F. Kzaiber, A. Oussama, F. Oliverio, R. Tauler, G. Ragno, Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils, *Food Chem.* 124 (2011) 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.010>.
- [136] W. Terouzi, M. De Luca, a. Bolli, a. Oussama, M. Patumi, G. Ioele, G. Ragno, A discriminant method for classification of Moroccan olive varieties by using direct FT-IR analysis of the mesocarp section, *Vib. Spectrosc.* 56 (2011) 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.01.004>.
- [137] J.C. Moore, J. Spink, M. Lipp, Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010, *J. Food Sci.* 77 (2012) R118–R126. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>.
- [138] J. Liu, J. Ren, Z.-M. Liu, B.-H. Guo, A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk, *Food Chem.* 172 (2015) 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>.
- [139] S.S. Souza, A.G. Cruz, E.H.M. Walter, J. a. F. Faria, R.M.S. Celeghini, M.M.C. Ferreira, D. Granato, A.D.S. Sant'Ana, Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach, *Food Chem.* 124 (2011) 692–695. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.074>.
- [140] S. MacMahon, T.H. Begley, G.W. Diachenko, S.A. Stromgren, A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods, *J. Chromatogr. A.* 1220 (2012) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.066>.
- [141] E. Domingo, A.A. Tirelli, C.A. Nunes, M.C. Guerreiro, S.M. Pinto, Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: A review, *Food Res. Int.* 60 (2014) 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.006>.
- [142] C. Martín-Hernández, M. Muñoz, C. Daury, H. Weymuth, A.E.M. Kemmers-Voncken, V. Corbatón, T. Toribio, M.G.E.G. Bremer, Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder, *Int. Dairy J.* 19 (2009) 205–208. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.016>.
- [143] G. Enne, D. Elez, F. Fondrini, I. Bonizzi, M. Feligini, R. Aleandri, High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix, *J. Chromatogr. A.* 1094 (2005) 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.004>.
- [144] I. Mafra, I.M. Ferreira, M.B.P.P. Oliveira, Food authentication by PCR-based methods, *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008) 649–665.
- [145] M. Bassbasi, M. De Luca, G. Ioele, A. Oussama, G. Ragno, Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data, *J. Food Compos. Anal.* 33 (2014) 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.010>.
- [146] R. KAROUI, J. DEBAERDEMAEKER, A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products, *Food Chem.* 102 (2007) 621–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>.
- [147] M. Bassbasi, M. De Luca, S. Souhassou, A. Hirri, M. Berkani, F. Kzaiber, G. Loele, G. Ragno, A. Oussama, Determination of Milk Adulteration by Sucrose Using FT-MIR Spectroscopy and Chemometrics Methods, *Agric. Sci. Res. J.* 11 (2014) 175–180. <http://resjournals.com/ARJ/Pdf/2014/Nov/Bassbasi-et-al.pdf>.
- [148] G. Konuspayeva, B. Faye, G. Loiseau, The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data, *J. Food Compos. Anal.* 22 (2009) 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.09.008>.
- [149] Å. Rinnan, F. van den Berg, S.B. Engelsen, Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 1201–1222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>.
- [150] K.H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L.P. Houmoller, Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design, *Multivariate Data Analysis*, 2002.
- [151] N. (Klaas) M. Faber, D.L. Duewer, S.J. Choquette, T.L. Green, S.N. Chesler, Characterizing the Uncertainty in Near-Infrared Spectroscopic Prediction of Mixed-Oxygenate Concentrations in Gasoline: Sample-Specific Prediction Intervals, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2972–2982. <https://doi.org/10.1021/ac971270b>.
- [152] B. Aernouts, E. Polshin, W. Saeys, J. Lammertyn, Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: A comparison of two sampling techniques and effect of homogenization, *Anal. Chim. Acta.* 705 (2011) 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.018>.

- [153] J. Spink, D.C. Moyer, Defining the Public Health Threat of Food Fraud, *J. Food Sci.* 76 (2011) R157--R163. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>.
- [154] X. Pei, A. Tandon, A. Alldrick, L. Giorgi, W. Huang, R. Yang, The China melamine milk scandal and its implications for food safety regulation, *Food Policy*. 36 (2011) 412–420. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.03.008>.
- [155] L.M. Reid, T. Woodcock, C.P. O'Donnell, J.D. Kelly, G. Downey, Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data, *Food Res. Int.* 38 (2005) 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.005>.
- [156] M. Bassbasi, S. Platikanov, R. Tauler, A. Oussama, FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods., *Food Chem.* 146 (2014) 250–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.044>.
- [157] L.K. Sorensen, M. Lund, B. Juul, Accuracy of Fourier transform infrared spectrometry in determination of casein in dairy cows' milk, *J. Dairy Res.* 70 (2003) 445–452. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=181931>.
- [158] S. Šašić, Y. Ozaki, Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy of Biological Fluids. 1. Quantitative Analysis of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Partial Least-Squares Regression and Band Assignment, *Anal. Chem.* 73 (2001) 64–71. <https://doi.org/10.1021/ac000469c>.
- [159] M. Bassbasi, F. Kzaiber, G. Ragno, A. Oussama, Classification of raw milk by infrared spectroscopy (FTIR) and chemometric, *J. Sci. Specul. Res.* 1 (2010) 28–33.
- [160] J. Moros, F.A. Iñón, M. Khanmohammadi, S. Garrigues, M. de la Guardia, Evaluation of the application of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectrometry (ATR–FTIR) and chemometrics to the determination of nutritional parameters of yogurt samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 708–715. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0418-1>.
- [161] I. V Mendenhall, R.J. Brown, Fourier Transform Infrared Determination of Whey Powder in Nonfat Dry Milk1, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 2896–2900. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78471-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78471-3).
- [162] N. Rodríguez, M.C. Ortiz, L. Sarabia, E. Gredilla, Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses, *Talanta*. 81 (2010) 255–264. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.067>.
- [163] K.H. Norris, P.C. Williams, Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size., *Cereal Chem.* (1984). http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1984/Documents/chem61_158.pdf.
- [164] R. Grappin, D. Lefier, G. Mazerolles, Analyse du lait et des produits laitiers, *La Spectrosc. Infrarouge Ses Appl. Anal.* (2000) 497–540.
- [165] H. Kubinyi, F.A. Hamprecht, T. Mietzner, Three-Dimensional Quantitative Similarity–Activity Relationships (3D QSiAR) from SEAL Similarity Matrices, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2553–2564. <https://doi.org/10.1021/jm970732a>.
- [166] J. RAMET P., G. NOVAK, P. EVERS A., H. NIJPELS H., Application de la cryométrie à la mesure de l'hydrolyse enzymatique du lactose, *Lait*. 59 (1979) 46–55. <https://doi.org/10.1051/lait:1979581-5824>.
- [167] J. V Wheelock, J.A.F. Rook, F.H. Dodd, The relationship in the cow between the osmotic pressure of milk and of blood, *J. Dairy Res.* 32 (1965) 79–88. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029900018392>.
- [168] P. Parguel, G. Corrot, O. Sauvee, Variations du point de congélation et principales causes du mouillage du lait de vache, *3R.* (1994) 129–132.
- [169] IDF (International Dairy Federation), Milk—Enumeration of somatic cells. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-optoelectronic counters, FIL-IDF Standard no. 148-2 (E), IDF, Brussels, Belgium, 2006.
- [170] IDF (International Dairy Federation), Whole milk, determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments, FIL-IDF Standard no. 141C, IDF, Brussels, Belgium, 2000.
- [171] J.A. Bertrand, Influence of Shipping Container, Preservative, and Breed on Analysis of Milk Components of Shipped Samples, *J. Dairy Sci.* 79 (1996) 145–148. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76346-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76346-4).
- [172] A. Sánchez, D. Sierra, C. Luengo, J.C. Corrales, C.T. Morales, A. Contreras, C. Gonzalo, Influence of storage and preservation on fossomatic cell count and composition of goat milk., *J. Dairy Sci.* 88 (2005) 3095–100. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72991-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72991-X).
- [173] A. Sánchez, D. Sierra, C. Luengo, J.C. Corrales, C. de la Fe, C.T. Morales, A. Contreras, C. Gonzalo, Evaluation of the MilkoScan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions., *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 3153–3161. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0038>.
- [174] D. Sierra, A. Sánchez, C. Luengo, J.C. Corrales, C.T. Morales, A. Contreras, C. Gonzalo, Temperature effects on Fossomatic cell counts in goats milk, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 385–387.

- <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.04.004>.
- [175] IDF (International Dairy Federation), Milk. Determination of freezing point. Thermistor cryoscope method (reference method), FIL-IDF Standard no. 108:2002/ISO 5764, IDF, Brussels, Belgium, 2002.
- [176] IDF (International Dairy Federation), Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory, FIL-IDF Standard no. 128A, IDF, Brussels, Belgium, 1999.
- [177] L. Szijarto, F.R. van de Voort, Determination of Added Water and Bovine Milk to Caprine Milk, *J. Dairy Sci.* 66 (1983) 620–623. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81833-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81833-5).
- [178] M.D. Rasmussen, M. Bjerring, P. Justesen, L. Jepsen, R.T.F.-V. Zonnenveld, Milk quality on Danish farms with automatic milking systems., *J. Dairy Sci.* 85 (2002) 2869–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74374-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74374-9).
- [179] G.H. Klungel, B.A. Slaghuis, H. Hogeveen, The Effect of the Introduction of Automatic Milking Systems on Milk Quality, *J. Dairy Sci.* 83 (2000) 1998–2003. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(00\)75077-6](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(00)75077-6).
- [180] D. Pomiès, J. Bony, Comparison of hygienic quality of milk collected with a milking robot vs. a conventional milking parlour., *Robot. Milk. Proc. Int. Symp. Held Lelystad, Netherlands, 17-19 August, 2000.* (2000) 122–123.
- [181] M. Kroger, Milk Sample Preservation, *J. Dairy Sci.* 68 (1985) 783–787. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80889-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80889-4).
- [182] J. PIEN, J. DÉsirANT, M. LAFONTAINE D., La recherche de l'eau oxygénée dans le lait, *Lait.* 34 (1954) 133–145. <https://doi.org/10.1051/lait:1954333-3347>.