

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2013/140350 A2**

(43) Date de la publication internationale  
26 septembre 2013 (26.09.2013)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/IB2013/052207

(22) Date de dépôt international :  
20 mars 2013 (20.03.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1252569 22 mars 2012 (22.03.2012) FR

(71) Déposant : SPECTRALYS INNOVATION [FR/FR];  
Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel, F-93230 Romainville (FR).

(72) Inventeurs : ACHARID, Abdelhaq; 3 place Pierre Contant d'Ivry, F-95400 Arnouville (FR). BIRLOUEZ-ARAGON, Inès; 4 rue Hélène Boucher, F-95120 Ermont (FR).

(74) Mandataires : PRIORI, Enrico et al.; Cabinet Ores, 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)

(54) Title : METHOD AND APPARATUS FOR CHARACTERISING SAMPLES BY MEASURING LIGHT SCATTERING AND FLUORESCENCE

(54) Titre : PROCÉDE ET APPAREIL DE CARACTERISATION D'ECHANTILLONS PAR MESURE DE LA DIFFUSION LUMINEUSE ET DE LA FLUORESCENCE.

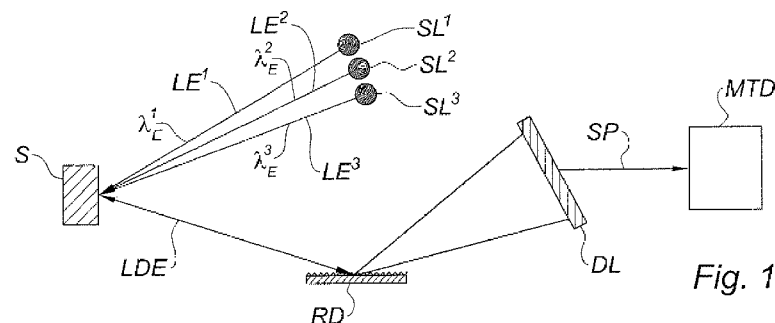


Fig. 1

(57) Abstract : A method for characterising at least one sample, comprising: a) the lighting of said or each sample to be analysed by  $N > 1$  light rays ( $LE^1 - LE^3$ ) at respective wavelengths of light ( $\lambda_{E^1} - \lambda_{E^3}$ ); b) the acquisition, for each of said light rays, of at least one fluorescent light intensity and at least one elastic scattering light intensity emitted by said or by each sample; c) for said or each sample, determining a vector indicator based on said fluorescent and elastic scattering light intensities; d) determining at least one parameter characterising each sample, or a method to which said sample was submitted, based on the corresponding vector indicator. Apparatus for implementing such a method.

(57) Abrégé : Procédé de caractérisation d'au moins un échantillon, comportant : a) l'éclairage dudit ou de chaque échantillon à analyser par  $N > 1$  rayonnements lumineux ( $LE^1 - LE^3$ ) à des longueurs d'onde d'éclairage respectives ( $\lambda_{E^1} - \lambda_{E^3}$ ); b) l'acquisition, pour chaque dit rayonnement lumineux, d'au moins une intensité lumineuse de fluorescence et d'au moins une intensité lumineuse de diffusion élastique émises par ledit ou par chaque échantillon; c) pour ledit ou chaque échantillon, la détermination d'un indicateur vectoriel à partir desdites intensités lumineuses de fluorescence et de diffusion élastique; d) la détermination d'au moins un paramètre caractérisant chaque échantillon, ou un procédé auquel ledit échantillon a été soumis, à partir de l'indicateur vectoriel correspondant. Appareil pour la mise en œuvre d'un tel procédé.



WO 2013/140350 A2

## PROCEDE ET APPAREIL DE CARACTERISATION D'ECHANTILLONS PAR MESURE DE LA DIFFUSION LUMINEUSE ET DE LA FLUORESCENCE

L'invention porte sur un procédé et un appareil de  
5 caractérisation d'échantillons, et notamment d'aliments, de médicaments, de  
milieux biologiques ou environnementaux exploitant des mesures de diffusion  
lumineuse et de fluorescence et un traitement statistique desdites mesures.

L'invention peut être appliquée en particulier, mais pas  
uniquement, à l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique. Par exemple,  
10 elle permet l'étude de l'évolution des propriétés nutritionnelles et/ou  
toxicologiques d'un aliment au cours de sa préparation ou conservation, ainsi  
que le contrôle des traitements auxquels un aliment est soumis (cuisson,  
torréfaction...).

L'invention peut également être appliquée à l'industrie  
15 environnementale, par exemple au traitement des eaux usées, des boues  
industrielles, des milieux en fermentation, etc.

Plus généralement, l'invention peut être appliquée à la  
détermination de tout indicateur de qualité d'un échantillon, et/ou de tout  
paramètre caractérisant un procédé auquel ledit échantillon a été soumis.

20 Le procédé se base sur des méthodes chimiométriques, et en  
particulier, dans des modes de réalisation avantageux de l'invention, sur  
l'analyse statistique multivariée ou – de préférence – multivoies de données  
spectroscopiques. L'analyse multivoies est l'extension naturelle de l'analyse  
multivariée lorsque les données sont arrangées dans des tableaux à trois  
25 voies ou plus. Elle se base sur l'utilisation de modèles statistiques tels que  
« PARAFAC » (« Parallel Factor», c'est à dire modèle à facteurs parallèles) et  
NPLS (« N-ways Partial Least Squares régression », c'est à dire régression  
par moindres carrés partiels à n-voies). On pourra se rapporter à ce propos à  
l'ouvrage de référence de R. Bro, « Multi-way Analysis in the Food Industry  
30 Models, Algorithms, and Applications », PhD thesis, Universiteit van  
Amsterdam, 1998.

Le document WO 2011/080408 décrit un procédé et un appareil d'analyse spectroscopique d'échantillons, en particulier alimentaires, mettant en œuvre un traitement multivoies de données spectroscopiques. Le procédé comprend l'éclairage de chaque échantillon à analyser par une pluralité de rayonnements lumineux d'excitation à des longueurs d'onde respectives ; l'acquisition d'une pluralité de spectres de fluorescence frontale de chaque échantillon, correspondant chacun à un rayonnement lumineux d'excitation respectif ; un prétraitement de ces spectres de fluorescence, destiné en particulier à leur soustraire une contribution due à la diffusion Rayleigh ; l'application aux spectres prétraités d'un modèle statistique multivoies et la détermination – par exemple par régression multilinéaire – d'un indicateur de qualité de chaque échantillon et/ou d'un paramètre caractérisant un procédé auquel chaque échantillon a été soumis.

Le document WO 2011/158192 décrit un procédé de caractérisation d'un ou plusieurs échantillons d'un produit agroalimentaire qui utilise également l'acquisition d'une pluralité de spectres de fluorescence frontale de chaque échantillon et leur traitement au moyen d'un procédé d'analyse multivoies des données. Ce procédé aboutit à la représentation de chaque échantillon par un point dans un espace multidimensionnel, ce qui permet le calcul d'une distance par rapport à un ou plusieurs échantillons de référence. Cette distance permet, par exemple, de quantifier la naturalité et/ou la fraîcheur de l'échantillon.

Les articles:

- « Analysis of visible reflectance spectra of stored, cooked and diseased chicken meats », Y. Lio et Y.-R. Chen, Meat Science 58 (2001), pages 395 – 401; et

- « The Use of Visible and Near-Infrared Reflectance Measurements to assess Sensory Changes in Carrot Texture and Sweetness during Heat Treatment », N. De Belie et al., Biosystems Engineering (2003) 85(2) pages 213 – 225

décrivent des procédés de caractérisation d'échantillons alimentaires, permettant en particulier d'étudier leur cuisson, basés sur l'application de procédés d'analyse multivoies à des spectres de réflectance.

La mise en œuvre de ces procédés est relativement  
5 complexe, et donc coûteuse, car elle nécessite l'acquisition et le traitement d'une pluralité de spectres, et donc d'un volume important de données.

L'invention vise à surmonter ces inconvénients de l'art antérieur.

Un objet de l'invention permettant d'atteindre ce but est un  
10 procédé de caractérisation d'au moins un échantillon, comportant :

- a) l'éclairage dudit ou de chaque échantillon à analyser par  $N \geq 1$  rayonnements lumineux à des longueurs d'onde d'éclairage respectives ;
- b) l'acquisition, pour chaque dit rayonnement lumineux, d'au moins une intensité lumineuse de fluorescence et d'au moins une intensité  
15 lumineuse de diffusion élastique émises par ledit ou par chaque échantillon ;
- c) pour ledit ou chaque échantillon, la détermination d'un indicateur vectoriel à partir desdites intensités lumineuses de fluorescence et de diffusion élastique ;
- d) la détermination d'au moins un paramètre caractérisant  
20 chaque échantillon, ou un procédé auquel ledit échantillon a été soumis, à partir de l'indicateur vectoriel correspondant.

Par rapport aux procédés précités connus de l'art antérieur, et plus particulièrement des documents WO 2011/080408 et WO 2011/158192, un procédé selon l'invention se caractérise par l'utilisation conjointe de  
25 données de fluorescence et de diffusion qui permet d'améliorer la caractérisation de l'échantillon et/ou de réduire le nombre de sources d'éclairage utilisées, et donc de simplifier l'instrumentation de mise en œuvre. Il convient de souligner que dans les documents WO 2011/080408 et WO 2011/158192 précités, l'intensité de la lumière diffusée est vue uniquement  
30 comme une nuisance perturbant l'acquisition des spectres de fluorescence, considérés les seuls porteurs d'information exploitable.

Selon différents modes de réalisation particuliers du procédé de l'invention :

- Lesdites intensités lumineuses de fluorescence et de diffusion élastique peuvent être acquises en mode frontal.
- 5           - Ladite étape a) peut comporter l'éclairage dudit ou de chaque échantillon à analyser par un nombre compris entre 1 et 6 de rayonnements lumineux sensiblement monochromatiques.
- Ladite étape b) peut comporter, pour ledit ou chaque échantillon, l'acquisition d'au moins un spectre de fluorescence et ladite étape
- 10       c) peut comporter, également pour ledit ou chaque échantillon
  - le calcul d'un vecteur de *scores* par application d'un modèle statistique multivarié ou multivoies au dit ou à chaque spectre de fluorescence, ledit modèle statistique étant défini par un vecteur de *loadings* d'éclairage et par un vecteur de *loadings* de fluorescence ; et
  - 15           - la concaténation dudit vecteur de *scores* avec au moins une valeur d'intensité de diffusion élastique ou un paramètre caractéristique d'au moins un spectre de diffusion élastique.
  - Ledit modèle statistique mis en œuvre à l'étape c) peut être choisi parmi un modèle PARAFAC et un modèle NPLS.
  - 20           - Ladite étape b) peut comporter, pour ledit ou chaque échantillon, l'acquisition d'au moins un spectre comprenant des contributions dues à la fluorescence et à la diffusion élastique, et la soustraction desdites contributions dues à la diffusion élastique du rayonnement lumineux d'excitation, lesdites contributions dues à la diffusion élastique pouvant
  - 25       notamment être calculées, notamment au moyen d'un modèle linéaire généralisé. En d'autres termes, un modèle linéaire généralisé peut être utilisé pour séparer les contributions dues à la fluorescence et à la diffusion élastique, ces deux contributions pouvant être ensuite utilisées pour la caractérisation de l'échantillon.
  - 30           - Le procédé peut comprendre également une phase préliminaire d'étalonnage comportant :

i) l'éclairage d'une pluralité d'échantillons d'étalonnage par lesdits  $N \geq 1$  rayonnements lumineux auxdites longueurs d'onde d'éclairage respectives ;

5           ii) l'acquisition, pour chaque dit échantillon d'étalonnage, dudit ou desdits spectres de fluorescence ;

          iii) la détermination, par une méthode itérative, desdits vecteurs de *loadings* du modèle statistique, ainsi que d'un vecteur de *scores* pour chaque échantillon d'étalonnage.

          - Ladite étape d) de détermination d'au moins un paramètre  
10   caractérisant chaque échantillon, ou un procédé auquel ledit échantillon a été soumis, peut être mise en œuvre par une méthode choisie parmi : une régression multilinéaire à partir dudit indicateur vectoriel ; le calcul d'une distance entre ledit indicateur vectoriel et un vecteur de référence ; un procédé de classification supervisée ou non-supervisée ; et une méthode de  
15   « scoring ».

          - Le procédé peut comprendre également une phase préliminaire d'étalonnage comportant la détermination d'une fonction liant ledit indicateur vectoriel aux valeurs, connues, dudit ou de chaque paramètre pour lesdits échantillons d'étalonnage.

20           - Ledit ou chaque échantillon peut être un produit choisi parmi un aliment, un médicament, un milieu biologique ou un milieu environnemental.

          - Ledit ou chaque dit paramètre scalaire ou vectoriel peut être représentatif d'une structure physico-chimique d'une matrice dudit  
25   échantillon, ou d'une transformation de ladite structure physico-chimique.

          Un autre objet de l'invention est un appareil de caractérisation d'au moins un échantillon comportant :

          - au moins une source lumineuse pour éclairer ledit ou chaque échantillon à analyser par  $N \geq 1$  rayonnements lumineux à des  
30   longueurs d'onde d'éclairage respectives ;

          - un moyen d'acquisition d'au moins une intensité lumineuse de fluorescence et d'au moins une intensité lumineuse de diffusion

élastique émises par ledit ou par chaque échantillon pour chaque dit rayonnement lumineux ; et

- un moyen de traitement des données représentant les intensités lumineuses acquises, programmé ou configuré pour mettre en œuvre un procédé tel que décrit ci-dessus. Le moyen de traitement des données peut être typiquement un ordinateur ou un processeur programmé de manière opportune.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront à la lecture de la description faite en référence aux dessins annexés donnés à titre d'exemple, dans lesquels:

- La figure 1 représente le schéma de principe d'un dispositif pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention ;
- Les figures 2A et 2B montrent comment la prise en compte conjointe de la fluorescence et de la diffusion élastique de la lumière améliore la prédiction du temps de cuisson de la viande de bœuf par rapport à l'utilisation de la fluorescence seule ;
- Les figures 3A et 3B montrent comment la prise en compte conjointe de la fluorescence et de la diffusion élastique de la lumière améliore la prédiction de l'évolution de la teneur en acrylamide au cours de la torréfaction de la chicorée par rapport à l'utilisation de la fluorescence seule ; et
- La figure 3C montre l'évolution de l'intensité de diffusion à 430 nm de la chicorée au cours de la torréfaction.

L'appareil de la figure 1 comprend trois sources de lumière monochromatique  $SL^1$ ,  $SL^2$  et  $SL^3$ , générant des rayonnements lumineux d'éclairage respectifs aux longueurs d'onde  $\lambda_E^1$ ,  $\lambda_E^2$ ,  $\lambda_E^3$ . Des modes de réalisation alternatifs d'un tel appareil pourraient comprendre un nombre supérieur ou inférieur de sources de lumières monochromatique (à la limite, une seule), voire une source lumineuse polychromatique générant l'ensemble des rayonnements d'éclairage.

Les rayonnements  $LE^1$ - $LE^3$  sont dirigés – simultanément ou à tour de rôle – vers l'échantillon S, qui peut être un solide, une poudre, un

liquide contenu dans un récipient transparent, etc. Suite à son éclairage par chaque rayonnement incident  $LE^i$ , l'échantillon S émet un rayonnement LDF qui comprend essentiellement deux contributions : l'une, à la même longueur d'onde que le rayonnement d'éclairage, due à la diffusion élastique ; l'autre, polychromatique, due à la fluorescence. Un réseau de diffraction RD décompose le rayonnement LDF en ses composantes spectrales. Le spectre lumineux résultant, SP, est acquis par un capteur matriciel DL, générant des signaux qui, après conversion en format numérique, sont traités par le moyen de traitement des données MTD.

10 Dans le mode de réalisation de la figure 1, la diffusion et la fluorescence sont détectées en mode frontal, c'est-à-dire du même côté de l'échantillon S qui reçoit la lumière incidente. Cela n'est pas essentiel.

De même, un élément dispersif autre qu'un réseau de diffraction – par exemple un prisme – peut être utilisé pour décomposer le rayonnement LDF en ses composantes spectrales ; il est même possible de remplacer l'élément dispersif par un spectromètre à transformée de Fourier. Selon une autre variante, on peut utiliser un détecteur de lumière ponctuel, mobile ou associé à un réseau ou prisme tournant (appareil de type monochromateur).

20 L'utilisation d'un réseau de diffraction présente un avantage, celui de donner accès à plusieurs ordres de diffraction. L'intérêt est de pouvoir accéder à l'amplitude de diffusion, même si le détecteur utilisé est saturé par une trop forte intensité lumineuse (de diffusion typiquement). La réplique due au second ordre de diffraction est en effet beaucoup plus faible que celle de premier ordre, et permet donc d'accéder à l'amplitude du pic de premier ordre (le rapport entre l'intensité diffractée dans chaque ordre étant constant, et ne dépendant que du réseau). On peut ainsi obtenir en même temps un signal de fluorescence élevé, et l'amplitude de diffusion.

Particulièrement lorsque les sources d'éclairage « monochromatiques » présentent des spectres relativement larges (par exemple, s'il s'agit de diodes électroluminescentes), le spectre acquis par le capteur DL comporte des contributions dues à la diffusion élastique et à la

fluorescence qui se chevauchent partiellement. Dans ce cas, un prétraitement peut être prévu afin de supprimer cette contribution ; le document précité WO 2011/080408 décrit un procédé de prétraitement de ce type, basé sur la prédiction de la région de diffusion qui chevauche la fluorescence via un  
5 modèle linéaire généralisé (GLZ) avec une fonction de liaison log. Ce même document décrit aussi d'autres opérations de prétraitement (normalisation, correction multiplicative de la dispersion...) qui peuvent également être appliquées à la présente invention.

Comme dans le procédé du document précité WO  
10 2011/080408, l'application d'un modèle statistique aux valeurs d'intensité lumineuse de fluorescence acquises par les capteurs DL<sup>i</sup> fournit un vecteur, dit « de scores », qui caractérise l'échantillon. Conformément à un mode de réalisation de l'invention, un indicateur vectoriel, ou vecteur explicatif, est construit par concaténation dudit vecteur de scores et d'une ou plusieurs  
15 valeurs d'intensité de diffusion élastique. A son tour, cet indicateur vectoriel permet d'obtenir un paramètre – scalaire ou vectoriel – caractérisant l'échantillon S ou un procédé auquel ce dernier a été soumis. De préférence, ledit ou chaque paramètre scalaire ou vectoriel sera représentatif d'une structure physico-chimique d'une « matrice » – solide, liquide ou en poudre –  
20 dudit échantillon ou d'une transformation d'une telle structure. Il peut s'agir, par exemple, de la teneur en un composé, ou en plusieurs composés d'une même famille, ou bien d'un paramètre quantifiant les modifications physico-chimiques de ladite matrice induites par un procédé tel qu'une cuisson. On entend par « matrice » le constituant principal de l'échantillon, formant une  
25 masse relativement homogène, présentant une continuité substantielle et pouvant contenir d'autres constituants minoritaires tels que des particules dispersées ou des gouttelettes en suspension.

Dans certains cas, le vecteur de « scores » de fluorescence peut être remplacé, ou complété, par un vecteur constitué par un certain  
30 nombre (généralement compris entre 1 et 6) de valeurs d'intensité de fluorescence à des longueurs d'onde discrètes.

Dans certains cas, l'indicateur vectoriel peut contenir également des informations sur la forme d'un ou plusieurs spectres de diffusion élastique. En effet, ces spectres ne sont pas nécessairement identiques aux spectres d'éclairage correspondants. Ainsi, par exemple, un  
 5 indicateur vectoriel peut être obtenu en concaténant un vecteur de scores de fluorescence, une ou plusieurs valeurs discrètes d'intensité de diffusion élastique et un ou plusieurs paramètres scalaires représentatifs de la forme ou de la largeur d'un ou plusieurs spectres de diffusion élastique.

La mise en œuvre du procédé nécessite tout d'abord une  
 10 phase d'étalonnage, impliquant une pluralité d'échantillons d'étalonnage  $S^i$ . Les spectres de fluorescence ainsi acquis – le cas échéant après « nettoyage » des contributions parasites dues à la diffusion élastique – sont organisées en un tenseur de données d'ordre trois (« cube de données »), dont les trois « voies » sont : les échantillons, les rayonnements d'éclairage,  
 15 longueurs d'onde des spectres de fluorescence. Si l'éclairage est monochromatique, les données sont représentées par un tenseur d'ordre deux.

Le modèle statistique appliqué aux données peut être du type « PARAFAC », qui consiste à décomposer un tenseur à trois voies  $X$  en une  
 20 somme de produits externes de trois vecteurs (« triades »)  $a_i$ ,  $b_i$ ,  $c_i$ , plus un résidu  $E$ , lui aussi sous la forme d'un « cube de données ». On peut donc écrire :

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} ,$$

Où : « i », qui court de 1 à  $I>1$ , est l'index des échantillons ;  
 25 « j » qui court de 1 à  $J>1$ , est l'index des longueurs d'onde d'éclairage ; « k », qui court de 1 à  $K>1$  est l'index des longueurs d'onde des spectres de fluorescence correspondant à chaque rayonnement d'éclairage ; « f » est l'index des  $F$  facteurs de décomposition PARAFAC. Le nombre  $F$  de facteurs peut être défini a priori, ou à l'aide de critères connus de l'art antérieur.

30 Le vecteur (à  $F$  composantes)  $\mathbf{a}_i=(a_{i1}...a_{iF})$  est appelé le vecteur des « scores » pour l'échantillon  $S^i$ , tandis que les vecteurs

$\mathbf{b}_j = (b_{j1} \dots b_{jF})$  et  $\mathbf{c}_k = (c_{k1} \dots c_{kF})$  sont les vecteurs des « *loadings* » d'éclairage et d'émission, respectivement, qui définissent le modèle statistique. Ces vecteurs sont déterminés, par des méthodes itératives connues (par exemple, moindres carrés alternés), de manière à minimiser la norme de Frobenius tensorielle du résidu  $E$ , soit la valeur de  $\|\mathbf{X} - \mathbf{X}_{\text{mat}}\|_{\text{FRO}}$ , où  $\mathbf{X}_{\text{mat}}$  correspond au cube de données du modèle PARAFAC (voir ci-dessous) et  $\|\cdot\|_{\text{FRO}}$  dénote la norme de Frobenius (ou toute autre norme adaptée).

Le modèle PARAFAC peut être réécrit sous forme matricielle de la manière suivante :

$$10 \quad \mathbf{X}_{\text{mat}} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T$$

où :

- $\mathbf{X}_{\text{mat}}$  est la matrice – de taille  $I \times (J \times K)$  – des intensités des différents rayonnements émis par fluorescence par les échantillons ; cette matrice contient la même information que le tenseur à trois voies  $\mathbf{X}$ , mais
- 15 organisée différemment ;
- $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{C}$  sont les matrices (de taille  $J \times F$  et  $K \times F$  éléments, respectivement) des « *loadings* » d'éclairage et d'émission, dont les colonnes sont formées par les vecteurs  $\mathbf{b}_j^T$  et  $\mathbf{c}_k^T$  ;
- $\mathbf{A}_{IF}$  est la matrice (de taille  $I \times F$ ) des « *scores* », dont les
- 20 colonnes sont formées par les vecteurs  $\mathbf{a}_i^T$  ;
- le symbole  $\otimes$  représente le produit tensoriel de Khatri-Rao ; et
- l'exposant  $T$  indique l'opération de transposition.

Ce modèle permet d'obtenir un vecteur de *scores* pour un

25 nouvel échantillon, après que l'étalonnage ait été effectué. Soit en effet  $\mathbf{X}_{\text{nouveau}}$  le vecteur à  $J \times K$  composantes contenant les spectres de fluorescence acquis pour ledit nouvel échantillon ; le vecteur (de dimensions  $F$ ) des *scores* pour ce nouvel échantillon est donné par

$$\mathbf{A}_{\text{nouveau}} = (\mathbf{B} \otimes \mathbf{C})^+ \mathbf{X}_{\text{nouveau}} ;$$

30 où l'exposant  $+$  indique l'inverse généralisé du produit tensoriel.

Il importe toutefois de noter que le modèle « PARAFAC » est empirique ; il n'est donc valide que pour des échantillons similaires à ceux qui ont servi à l'étalonnage.

Puis, un indicateur vectoriel est construit à partir des vecteurs  
5 de scores et, par exemple, d'une ou plusieurs valeurs d'intensité de diffusion élastique, voire également d'une ou plusieurs valeurs d'intensité de fluorescence à des longueurs d'onde discrètes. Cela pourra être effectué simplement par concaténation.

Ensuite, un modèle de régression multilinéaire peut être  
10 construit à partir des données d'étalonnage pour permettre la prédiction, en fonction dudit indicateur vectoriel, d'un paramètre (voire plusieurs) caractérisant les échantillons et/ou un procédé auxquels ils ont été soumis. Ce paramètre peut être par exemple la teneur en un composant déterminé, ou un temps de cuisson. Bien entendu, la valeur du paramètre caractérisant doit  
15 être connue pour les échantillons d'étalonnage.

Plusieurs variantes du procédé de caractérisation décrit ci-dessus peuvent être envisagées sans sortir du cadre de la présente invention. Par exemple, le modèle statistique peut ne pas être de type PARAFAC mais, par exemple, N-PLS, ou d'un autre type connu (voir à ce propos l'ouvrage  
20 précité de R. Bro). En outre, le passage des indicateurs vectoriels (qui peuvent être constitués, on le rappelle, par les vecteurs de scores de fluorescence concaténés à des paramètres représentatifs de la diffusion élastique) aux paramètres caractérisant les échantillons peut se faire autrement que par régression multilinéaire, par exemple par calcul d'une  
25 distance – euclidienne ou de Mahalanobis – entre l'indicateur vectoriel de chaque échantillon considéré et celui d'un échantillon de référence. Il est également possible d'avoir recours à des techniques de classification supervisée ou non supervisée, ou à une méthode supervisée connue sous le nom de « scoring ».

30 Le « scoring » est une technique de hiérarchisation des données qui permet d'évaluer par une note (« score ») la probabilité qu'un échantillon ou un groupe d'échantillons ressemble à un autre échantillon ou

un autre groupe d'échantillons. Cette probabilité est calculée à partir des indicateurs vectoriels définis ci-dessus.

A titre d'exemple non limitatif, on peut procéder de la manière suivante :

- 5 A partir des scores PARAFAC de fluorescence et des intensités de diffusion, on construit une matrice  $\mathbf{M}(n \times m)$  où  $n$  est le nombre des échantillons, et  $m$  le nombre de variable, c'est-à-dire de composantes de chaque indicateur vectoriel.

10 Un vecteur indicateur de distance  $y$  est ensuite calculé en utilisant un modèle linéaire de régression

$$\mathbf{y} = \mathbf{b}_1 \mathbf{a}_1 + \mathbf{b}_2 \mathbf{a}_2 + \dots + \mathbf{b}_m \mathbf{a}_m + \mathbf{e}$$

Le vecteur  $\mathbf{y}$  est binaire et prend les valeurs : zéro pour les échantillons dits de référence, et un pour les échantillons à caractériser. Les vecteurs  $\mathbf{a}_i$  sont les colonnes de la matrice  $\mathbf{M}$ , les scalaires  $b_i$  sont les coefficients du modèle linéaire;  $\mathbf{e}$  est le vecteur des résidus.

15

Un test  $t$  de Student est appliqué aux distances  $\widehat{y}_r$  prédites à partir des scores et diffusions de l'échantillon de référence et des distances  $\widehat{y}_s$  prédites à partir des de scores et diffusions de l'échantillon à caractériser. La statistique  $t$  est calculée par l'équation suivante :

$$t = \frac{(\overline{\widehat{y}_r} - \overline{\widehat{y}_s})}{\sqrt{\frac{S_{\widehat{y}_r}}{n_r} + \frac{S_{\widehat{y}_s}}{n_s}}}$$

20 Où  $\overline{\widehat{y}_r}$ ,  $\overline{\widehat{y}_s}$ ;  $S_{\widehat{y}_r}$ ;  $S_{\widehat{y}_s}$ ;  $n_r$  et  $n_s$  sont respectivement les moyennes des distances prévues par le modèle linéaire de régression, leurs variances ( $S$ ) et le nombre de répliques ( $n$ ) utilisées lors du calibrage pour la référence (indice  $r$ ), et pour l'échantillon (indice  $s$ ).

25 La note de « scoring » est exprimée en fonction de la densité de probabilité :

$$p(t) = \frac{\Gamma\left(\frac{\nu+1}{2}\right)}{\sqrt{\nu\pi} \Gamma\left(\frac{\nu}{2}\right)} \left(1 - \frac{t^2}{\nu}\right)^{-0.5(\nu+1)} \quad ; \text{ pour } \nu \geq 1$$

Où  $\Gamma$  est la fonction gamma d'Euler et  $\nu$  le degré de liberté

$$\nu = \frac{\left(\frac{S_{\hat{y}_r}}{n_r} + \frac{S_{\hat{y}_s}}{n_s}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_{\hat{y}_r}}{n_r}\right)^2}{(n_r - 1)} + \frac{\left(\frac{S_{\hat{y}_s}}{n_s}\right)^2}{(n_s - 1)}}$$

Les échantillons présentant une probabilité externe plus élevée, sur la base de l'hypothèse nulle sur les distributions ( $H_0 : \overline{\hat{y}_r} = \overline{\hat{y}_s}$ )  
 5 reçoivent les notes les plus élevées, c'est-à-dire les plus proches de 1.

Le résultat technique de l'invention sera illustré ci-dessus à l'aide de deux exemples d'application.

Le premier exemple concerne le contrôle de la cuisson d'un aliment, et en particulier de la viande de bœuf.

10 La mesure de la diffusion par analyse de la réflectance de la surface d'un morceau de viande en cours de cuisson permet de tracer une courbe cinétique du niveau de cuisson. Les variations de l'intensité lumineuse diffusée au cours du temps reflètent notamment la formation d'agrégats protéiques issus de la dénaturation des protéines à la chaleur, phénomène qui  
 15 se répercute sur le plan visuel par le changement de couleur du milieu. Dans le cas d'autres aliments, poisson ou blanc d'œuf, on note plutôt une perte de transparence du milieu. Dans le cas du chauffage ou du caillage du lait, aucune modification n'est perceptible à l'œil nu, mais une mesure quantitative montre que même dans ce cas la diffusion évolue en rapport avec la  
 20 formation d'agrégats de protéines sériques dénaturées. La fluorescence est également affectée par les transformations chimiques et physico-chimiques qui se produisent au cours de la cuisson. Il est donc possible de définir un niveau de cuisson optimal et sa traduction en termes de cinétique d'évolution de la diffusion ou – mieux – de la combinaison diffusion-fluorescence,  
 25 mesurées sous forme de distance (Euclidienne ou de Mahalanobis) par

rapport au niveau initial. Une autre approche consiste à construire une régression sur le temps de cuisson et identifier le temps optimal prédit par la combinaison des signaux de fluorescence et de diffusion.

- Le tableau I indique les coefficients de corrélation obtenus
- 5 entre les différents scores PARAFAC calculés pour des échantillons de viande de bœuf cuits au grill à 180°C pendant 10 min, pour les quatre facteurs identifiés (Fact1 à Fact4), ainsi que les intensités maximales de diffusion et de fluorescence à différentes longueurs d'onde (on parle d'intensité maximale, car les spectres de diffusion et de fluorescence présentent une largeur finie).
- 10 Plus précisément :
- D1S1 correspond à l'intensité maximale de diffusion élastique d'un rayonnement d'éclairage à 280 nm, mesurée en correspondance du premier ordre de diffraction du réseau RD ;
  - D1S2 correspond à l'intensité maximale de diffusion
  - 15 élastique d'un rayonnement d'éclairage à 375 nm, mesurée en correspondance du premier ordre de diffraction du réseau RD ;
  - D2S2 correspond à l'intensité de diffusion à 375 nm, mesurée en correspondance du second ordre de diffraction du réseau RD ; et
  - D1S3 correspond à l'intensité maximale de diffusion
  - 20 élastique d'un rayonnement d'éclairage à 430 nm, mesurée en correspondance du premier ordre de diffraction du réseau RD.

Le tableau de corrélation montre d'une part que la fluorescence est corrélée significativement à la diffusion et que fluorescence comme diffusion sont corrélés au temps de cuisson.

	Fact1	Fact2	Fact3	Fact4	D1S1	D1S2	D2S2	D1S3	temps
Fact1	1	-0,95	0,52	-0,96	0,55	0,48	0,50	-0,06	-0,58
Fact2		1	-0,48	0,88	-0,48	-0,43	-0,45	0,05	0,60
Fact3			1	-0,72	-0,06	-0,03	-0,04	-0,36	-0,19
Fact4				1	-0,43	-0,40	-0,41	0,17	0,55
D1S1					1	0,77	0,77	0,61	-0,55
D1S2						1	1	0,71	-0,44
D2S2							1	0,69	-0,44
D1S3									-0,30
temps									1

La figure 2A illustre le modèle de régression multilinéaire du temps de cuisson (axe des abscisses : temps de cuisson prédit, en minutes ; axe des ordonnées : temps de cuisson réel) obtenu uniquement à partir des données de fluorescence (vecteurs des scores des quatre facteurs PARAFAC) ; la figure 2B illustre le modèle de régression obtenu en utilisant également l'intensité maximale de diffusion élastique à 280 nm (D1S1). Dans les deux cas, l'étalonnage a été effectué sur une base de 14 échantillons. On peut observer que la prise en compte de la diffusion élastique améliore de manière très considérable la prédiction du temps de cuisson ; en effet, l'erreur quadratique moyenne de prédiction passe de 1,60 minute à 0,35 minute.

Le deuxième exemple concerne l'évolution de la teneur en acrylamide de la chicorée au cours de sa torréfaction.

Le tableau II indique les coefficients de corrélation obtenus entre les différents scores PARAFAC pour quatre facteurs (Fact1 à Fact4), ainsi que les intensités maximales de diffusion et de fluorescence à différentes longueurs d'onde. D1S1, D1S2 et D1S3 ont été définis en précédence ; D2S1 correspond à la diffusion élastique à 280 nm observée au second ordre de diffraction du réseau RD.

	Fact1	Fact2	Fact3	Fact4	D1S1	D1S2	D2S2	D1S3	Acrylamide
Fact1	1	0,46	-0,91	-0,68	-0,60	-0,76	-0,90	-0,97	0,15
Fact2		1	-0,78	0,17	-0,33	-0,64	-0,52	-0,44	-0,68
Fact3			1	0,38	0,57	0,83	0,88	0,88	0,22
Fact4				1	0,50	0,37	0,59	0,70	-0,72
D1S1					1	0,90	0,79	0,62	-0,01
D2S1						1	0,92	0,77	0,25
D1S2							1	0,93	0,03
D1S3									-0,16
Acrylamide									1

Tableau II

La figure 3C montre l'évolution de la diffusion à 430 nm au cours du procédé de torréfaction, subdivisé en 13 étapes pour une durée totale de 3h environ. La diminution progressive de l'intensité de diffusion

correspond à l'absorption induite par les molécules de Maillard ; elle est bien corrélée à la couleur, mesurée avec un colorimètre.

La figure 3A illustre le modèle de régression multilinéaire de la teneur en acrylamide (axe des abscisses : teneur prédite, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ; axe des ordonnées : teneur mesurée) obtenu uniquement à partir des données de fluorescence; la figure 3B illustre le modèle de régression obtenu en utilisant également la diffusion élastique. Dans les deux cas, l'étalonnage a été effectué sur une base 68 échantillons. Comme dans le cas du contrôle de la cuisson de la viande on observe une amélioration sensible de la prédiction, avec une erreur quadratique moyenne qui passe de 356  $\mu\text{g}/\text{kg}$  à 276  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## **REVENDICATIONS**

1. Procédé de caractérisation d'au moins un échantillon, comportant :
- 5 a) l'éclairage dudit ou de chaque échantillon à analyser par  $N \geq 1$  rayonnements lumineux ( $LE^1 - LE^3$ ) à des longueurs d'onde d'éclairage respectives ( $\lambda_E^1 - \lambda_E^3$ ) ;
- b) l'acquisition, pour chaque dit rayonnement lumineux, d'au moins une intensité lumineuse de fluorescence et d'au moins une intensité
- 10 lumineuse de diffusion élastique émises par ledit ou par chaque échantillon ;
- c) pour ledit ou chaque échantillon, la détermination d'un indicateur vectoriel à partir desdites intensités lumineuses de fluorescence et de diffusion élastique ;
- d) la détermination d'au moins un paramètre caractérisant
- 15 chaque échantillon, ou un procédé auquel ledit échantillon a été soumis, à partir de l'indicateur vectoriel correspondant.
2. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel lesdites intensités lumineuses de fluorescence et de diffusion
- 20 élastique sont acquises en mode frontal.
3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel ladite étape a) comporte l'éclairage dudit ou de chaque échantillon à analyser par un nombre compris entre 1 et 6 de rayonnements
- 25 lumineux sensiblement monochromatiques.
4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel ladite étape b) comporte, pour ledit ou chaque échantillon, l'acquisition d'au moins un spectre de fluorescence et ladite étape c)
- 30 comporte, également pour ledit ou chaque échantillon :
- le calcul d'un vecteur de scores par application d'un modèle statistique multivarié ou multivoies au dit ou à chaque spectre de

fluorescence, ledit modèle statistique étant défini par un vecteur de *loadings* d'éclairage et par un vecteur de *loadings* de fluorescence ; et

- la concaténation dudit vecteur de *scores* avec au moins une valeur d'intensité de diffusion élastique ou un paramètre caractéristique d'au moins un spectre de diffusion élastique.

5

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel ledit modèle statistique mis en œuvre à l'étape c) est choisi parmi un modèle PARAFAC et un modèle NPLS.

10

6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, dans lequel ladite étape b) comporte, pour ledit ou chaque échantillon, l'acquisition d'au moins un spectre comprenant des contributions dues à la fluorescence et à la diffusion élastique, et la soustraction desdites contributions dues à la diffusion élastique du rayonnement lumineux d'excitation, lesdites contributions dues à la diffusion élastique étant calculées au moyen d'un modèle linéaire généralisé.

15

7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, comprenant également une phase préliminaire d'étalonnage comportant :

20

i) l'éclairage d'une pluralité d'échantillons d'étalonnage par lesdits  $N \geq 1$  rayonnements lumineux auxdites longueurs d'onde d'éclairage respectives ;

25

ii) l'acquisition, pour chaque dit échantillon d'étalonnage, dudit ou desdits spectres de fluorescence ;

iii) la détermination, par une méthode itérative, desdits vecteurs de *loadings* du modèle statistique, ainsi que d'un vecteur de *scores* pour chaque échantillon d'étalonnage.

30

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel ladite étape d) de détermination d'au moins un paramètre

caractérisant chaque échantillon, ou un procédé auquel ledit échantillon a été soumis, est mise en œuvre par une méthode choisie parmi :

- une régression multilinéaire à partir dudit indicateur vectoriel ;
- 5                   - le calcul d'une distance entre ledit indicateur vectoriel et un vecteur de référence ;
- un procédé de classification supervisée ou non-supervisée ; et
- une méthode de « scoring ».

10

9. Procédé selon la revendication 8, comprenant également une phase préliminaire d'étalonnage comportant la détermination d'une fonction liant ledit indicateur vectoriel aux valeurs, connues, dudit ou de chaque paramètre pour lesdits échantillons d'étalonnage.

15

10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel ledit ou chaque échantillon est un produit choisi parmi un aliment, un médicament, un milieu biologique ou un milieu environnemental.

20

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel ledit ou chaque dit paramètre scalaire ou vectoriel est représentatif d'une structure physico-chimique d'une matrice dudit échantillon, ou d'une transformation de ladite structure physico-chimique.

25

12. Appareil de caractérisation d'au moins un échantillon comportant :

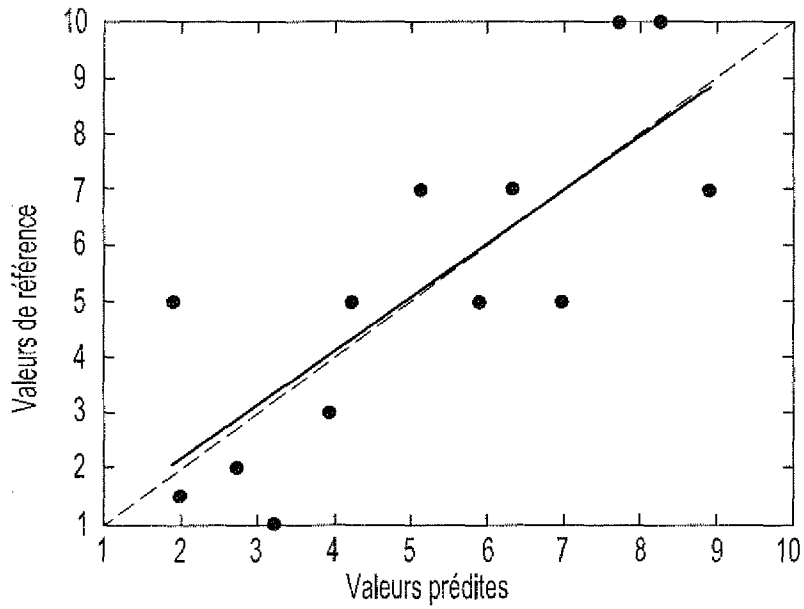
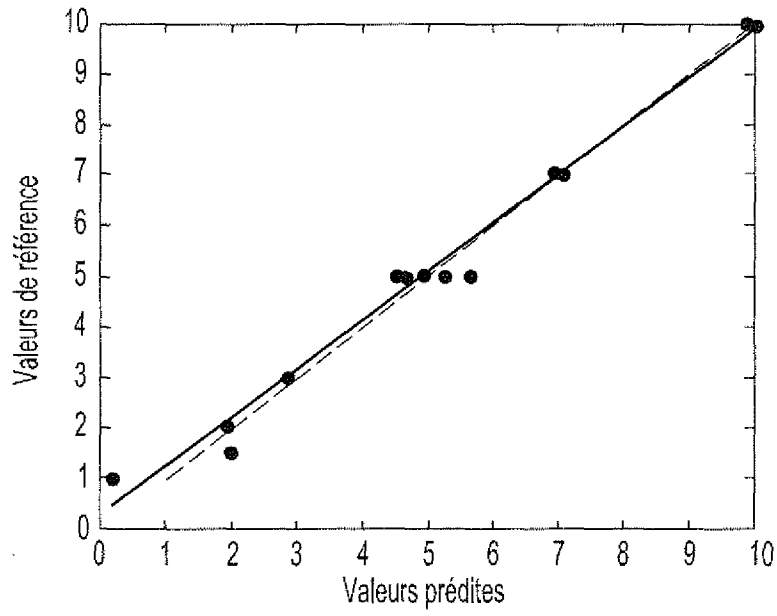
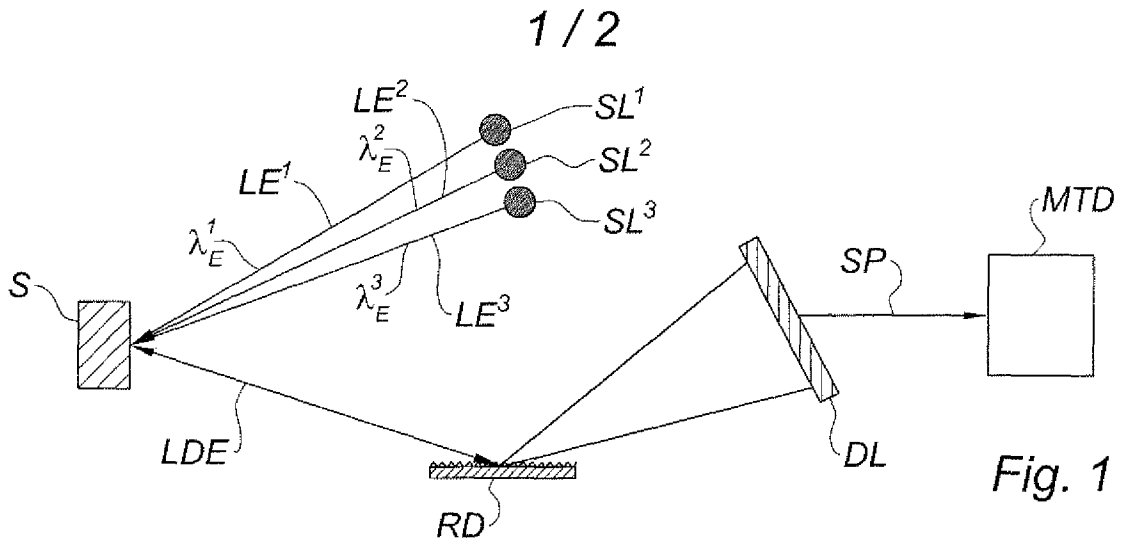
- au moins une source lumineuse (SL1- SL3) pour éclairer ledit ou chaque échantillon à analyser par  $N \geq 1$  rayonnements lumineux (LE) à des longueurs d'onde d'éclairage respectives ( $\lambda_E^1 - \lambda_E^3$ ) ;

30

- un moyen d'acquisition (DL) d'au moins une intensité lumineuse de fluorescence et d'au moins une intensité lumineuse de diffusion

élastique émises par ledit ou par chaque échantillon pour chaque dit rayonnement lumineux ; et

- un moyen de traitement des données (MTD) représentant les intensités lumineuses acquises, programmé ou configuré pour mettre en
- 5 œuvre un procédé selon l'une des revendications 1 à 11.



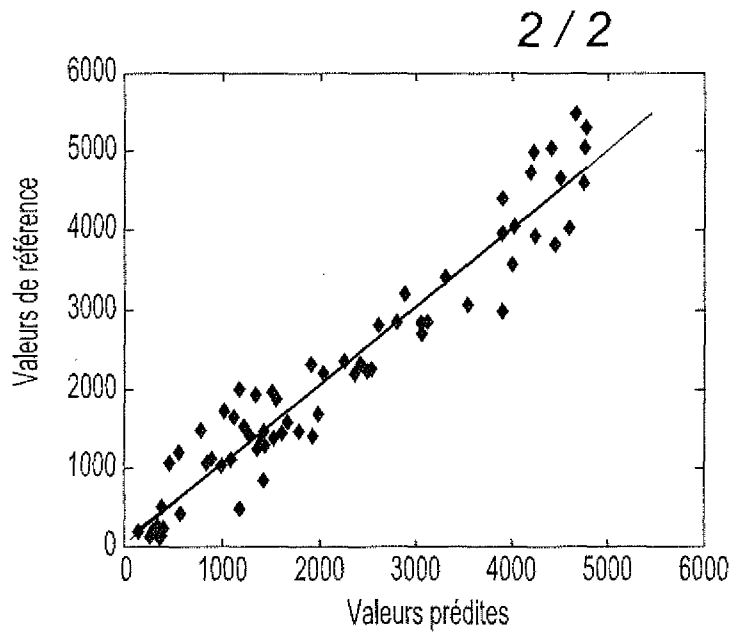


Fig. 3A

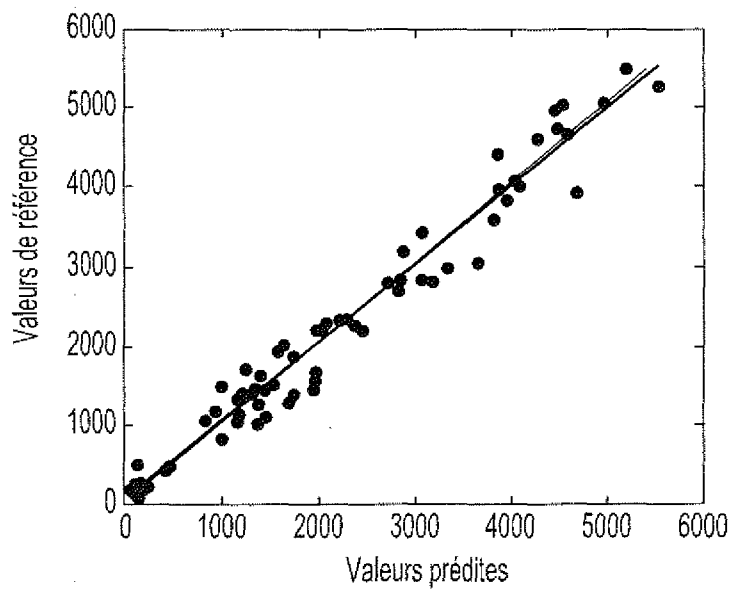


Fig. 3B

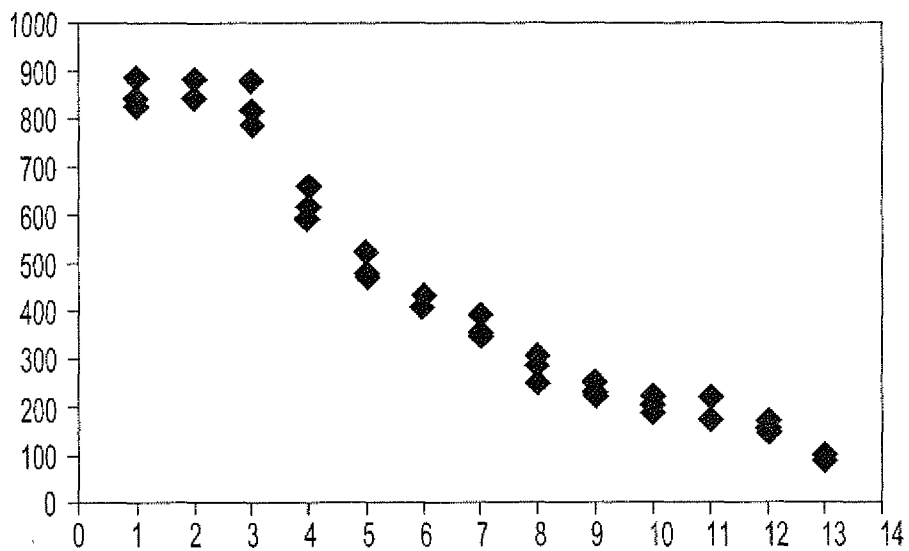


Fig. 3C