



HAL
open science

Caractérisation de l'état de liaison du sel par spectroscopie RMN du noyau sodium Rapport de stage

Camille Geliot, Sylvie Clerjon

► To cite this version:

Camille Geliot, Sylvie Clerjon. Caractérisation de l'état de liaison du sel par spectroscopie RMN du noyau sodium Rapport de stage. Sciences de l'ingénieur [physics]. 2022. hal-04438344

HAL Id: hal-04438344

<https://hal.inrae.fr/hal-04438344>

Submitted on 5 Feb 2024

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

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



IUT CLERMONT AUVERGNE

Aurillac - Clermont-Ferrand - Le Puy-en-Velay
Montluçon - Moulins - Vichy



Caractérisation de l'état de liaison du sel par spectroscopie RMN du noyau sodium

Rapport de stage



Camille GELIOT

2^e année de DUT Mesures Physiques
Année 2021 – 2022

Tuteur de stage : Fabrice ROSSI

Tuteurs entreprises : Sylvie CLERJON,
Guilhem PAGES

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma tutrice d'entreprise, Sylvie Clerjon, ingénieure de recherche, pour m'avoir prise en charge tout au long de cette période, ainsi que pour m'avoir apporté tant de nouvelles connaissances. Je remercie également Guilhem Pages, mon co-tuteur, ingénieur de recherche lui aussi, ainsi que toute l'unité QuaPA pour m'avoir si bien accueillie au sein de leur équipe, et tout particulièrement la plateforme AgroResonance, pour m'avoir soutenue et aidée lorsque j'étais en difficulté. Je remercie les autres unités ainsi que l'ensemble du Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes pour m'avoir permis de découvrir d'autres secteurs de recherche et m'avoir donné l'opportunité de visiter l'institut. Je remercie également mon tuteur de stage Fabrice Rossi, pour son suivi durant ces onze semaines.

Sommaire

1. Introduction.....	1
2. Présentation de l'entreprise.....	3
2.1. INRAE.....	3
2.2. Centre de recherche Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes.....	3
2.3. Unité QuaPA.....	4
2.4. Plateforme AgroResonance.....	4
3. Etude expérimentale.....	5
3.1. Projet Sal&Mieux.....	5
3.2. Manipulations.....	5
3.2.1. Principe.....	5
3.2.2. Spectromètre, antenne, chaine électronique, prétraitement.....	7
3.2.3. Protocoles de préparation des échantillons.....	10
3.2.4. Protocoles d'acquisition au spectromètre.....	14
3.2.4.1. Réglages préalables.....	14
3.2.4.1.1. Le WOBB.....	14
3.2.4.1.2. Le Shim.....	15
3.2.4.1.3. Mesure de la fréquence de résonance (paramètre O1 sous TopSpin).....	15
3.2.4.1.4. Réglage de la durée du pulse (paramètre p1 sous TopSpin).....	15
3.2.4.2. Acquisition RMN.....	16
3.2.5. Analyses des données.....	16
3.2.6. Régulation en température.....	19
3.3. Résultats et interprétations.....	20
4. Conclusion et perspectives.....	22
Liste des figures.....	24
Liste des tableaux.....	26
Glossaire.....	28
Bibliographie.....	30
Annexe 1 : Protocole de préparation d'un échantillon de carotte entière salée dans l'eau.....	
Annexe 2 : Protocole de préparation d'un échantillon de carotte entière salée à l'assiette.....	
Annexe 3 : Protocole TopSpin.....	
Annexe 4 : Références du matériel utilisé.....	

1. Introduction

Limiter l'apport en sodium a été identifié comme un levier efficace pour prévenir les maladies chroniques comme par exemple les maladies cardio-vasculaires. Malheureusement, cet apport par l'alimentation reste en moyenne deux fois plus élevé que le niveau recommandé par les organisations de santé publique. Les principales sources de sodium comprennent les produits alimentaires fabriqués industriellement, mais aussi le sel discrétionnaire ajouté par les consommateurs lors de la préparation des repas, et à table lors de l'assaisonnement. Il est toujours d'actualité de trouver une manière de réduire cette surconsommation afin de préserver au mieux notre santé. De nombreux projets ont déjà été menés pour réduire la teneur en sel des produits industriels. Le projet dans lequel s'inscrit mon stage vise, lui, à fournir des solutions pour réduire la quantité de sel discrétionnaire, ce qui est nouveau.

Dans le cadre de ce stage, mes recherches contribuent au projet Sal&Mieux, financé par l'Agence Nationale de la Recherche, visant l'amélioration de recettes culinaires en limitant l'utilisation du sel, sans pour autant limiter la qualité gustative des aliments. Le projet Sal&Mieux fait référence à divers aliments. Durant ce stage, mes recherches se sont focalisées sur la carotte. Différentes manières de les cuisiner et de les saler sont analysées puis comparées. Pour cela, des expériences sont réalisées par spectroscopie RMN du noyau sodium, afin de déterminer l'état de liaison du sel dans ces différentes préparations.

2. Présentation de l'entreprise

2.1. INRAE

INRAE, l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, dont le logo est représenté *figure 1*, est un acteur majeur de la recherche et de l'innovation créé le 1^{er} janvier 2020. Institut de recherche finalisé issu de la fusion entre INRA et IRSTEA, INRAE rassemble une communauté de 12 000 personnes, avec 267 unités de recherche, service et expérimentales implantées dans 18 centres de recherche sur toute la France.



Figure 1 : Logo de l'Institut

L'institut se positionne parmi les tous premiers organismes de recherche au monde en sciences agricoles et alimentaires, en sciences du végétal et de l'animal, et en écologie-environnement. Il est le premier organisme de recherche mondial spécialisé sur l'ensemble « agriculture-alimentation-environnement ».

Cet institut consacre ses recherches à l'amélioration d'une alimentation saine et de qualité, tout en préservant et valorisant l'environnement, ainsi qu'une agriculture durable.

2.2. Centre de recherche Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes

Au cœur des terres fertiles de Limagne et des pâturages du Massif, ce centre est un des sites historiques de l'Institut, avec des recherches de pointe dans des secteurs clés de l'agriculture, de l'environnement et de l'alimentation. Avec près de 850 agents répartis dans 20 unités sur 8 implantations, ce centre est largement ancré dans le territoire.

Six axes thématiques sont identifiés comme structurants pour INRAE dans la région Auvergne-Rhône-Alpes. Ce centre participe à 5 d'entre eux :

- agroécologie des systèmes d'élevage herbagers, qualité des produits et santé animale ;
- biologie intégrative des plantes modèles et cultivées et adaptation à leur environnement ;
- territoires et socio-écosystèmes : qualifications, trajectoires et accompagnement au changement ;
- risques naturels, sanitaires et environnementaux ;
- nutrition humaine, complexité alimentaire et santé.

2.3. Unité QuaPA

Mes recherches s'intègrent à l'unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) représenté par le logo *figure 2*.



Figure 2 : Logo de l'unité QuaPA

La viande et les produits carnés sont des aliments dont la richesse en protéines et l'équilibre en acides aminés indispensables sont parfaitement adaptés à l'Homme. Améliorer la qualité de ces aliments et leur technologie est au cœur des travaux des chercheurs de l'unité avec 2 axes porteurs : la conception raisonnée d'aliments carnés spécifiques, et l'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires dans un contexte de transition, notamment au travers des études sur la sécurité chimique des produits, la limitation des pertes en produits d'origine animale au cours des procédés et la valorisation de la biomasse issue des coproduits animaux.

L'unité QuaPA est rattachée au département TRANSFORM et travaille sur le site de Theix du Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes (lieu du stage).

Elle est structurée en trois équipes de recherche disciplinaires : Biochimie et Protéines du Muscle (BPM), Imagerie et Transferts (IT) Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives (MASS) et deux plateformes : AgroResonance et Protéomique. Durant ces onze semaines, ce stage a eu lieu au sein de la plateforme AgroResonance.

2.4. Plateforme AgroResonance

La plateforme AgroResonance est une infrastructure au service de la communauté scientifique et industrielle. Elle est située sur le site de Theix. Elle réunit des compétences et un parc technologique de haut niveau dans les domaines de l'agro-alimentaire, du végétal, de la nutrition et de la santé. Cette plateforme est plus précisément composée au début de ce stage d'un directeur de recherche

(responsable), de trois ingénieurs de recherche, un assistant ingénieur, une technicienne et trois étudiantes en thèse. Les outils consistent essentiellement en trois IRM à haut champ magnétique et un appareil original à bas champ, transportable pour des mesures en dehors du laboratoire.

3. Etude expérimentale

3.1. Projet Sal&Mieux

Selon certaines études, le sel discrétionnaire est une source qui peut contribuer jusqu'à 30% de l'apport total en sodium. Cette source n'est malheureusement pas suffisamment reconnue compte tenu de son utilisation quotidienne, mais elle peut être optimisée afin de réduire l'apport en sodium via l'alimentation.

Le projet collaboratif Sal&Mieux fédère l'expertise de 5 partenaires académiques pour étudier l'optimisation et la limitation de l'utilisation du sel de table, tout en le rendant plus efficace pour maintenir le goût salé et l'appréciation des aliments.

Quatre questions de recherche principales sont abordées, à commencer par l'étude des pratiques des consommateurs quant à l'utilisation du sel de table à la maison.

La deuxième question est axée sur les interactions physico-chimiques entre le sel et différents types d'aliments en fonction de différentes pratiques de cuisson et d'assaisonnement afin de comprendre comment le sel entre dans les aliments et comment il en ressort lors de la dégustation. L'objectif est de comprendre si le sel ajouté est disponible pour les récepteurs gustatifs et donc dans quelle mesure ce sel participe effectivement au goût salé.

La perception du sel fait l'objet de la troisième question. En effet, des équipes cherchent à identifier les conditions de préparation et d'assaisonnement qui permettent d'utiliser la quantité juste nécessaire de sel afin qu'il soit perçu de manière optimale et ainsi puisse contribuer à l'appréciation durable des aliments tout en limitant l'apport en sodium.

Enfin, dans la quatrième question, des équipes vont travailler sur la création de messages diffusant des recommandations, des conseils et des astuces aux consommateurs pour qu'ils puissent adopter les meilleures pratiques d'utilisation du sel de table identifiées et prouvées scientifiquement dans le cadre du projet.

Globalement, ce projet vise à aider le consommateur à réduire ses apports en sodium en lui proposant, non pas seulement de limiter sa consommation de sel de table, comme c'est le cas aujourd'hui dans les campagnes de sensibilisation, mais en lui fournissant des conseils éprouvés lui permettant d'utiliser plus efficacement le sel de table, et ainsi contribuer à ses attentes en termes de goût et d'habitudes culinaires, tout en préservant durablement sa santé et son bien-être.

3.2. Manipulations

3.2.1. Principe

L'état de liaison du sel est ici caractérisé par spectroscopie RMN du noyau sodium.

La spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques.

A l'état naturel, dans le noyau de l'atome, les particules possèdent des propriétés internes, telles que la masse ou la charge électrique, mais aussi le spin. En dehors de toute contrainte extérieure, chaque spin possède une orientation quelconque, le magnétisme résultant est alors nul à notre échelle. Mais, lorsqu'un champ magnétique extérieur est appliqué (B_0), ils ont tendance à s'ordonner dans ce champ (voir *a*) *figure 3*), produisant un ordre tel qu'une aimantation nucléaire macroscopique peut alors être perçue. En apportant de l'énergie au système (impulsion d'une durée de l'ordre de la ms d'un champ B_1 perpendiculaire à B_0), sous forme d'ondes électromagnétiques à des fréquences du même ordre de grandeur que celles des ondes radios, il est possible de provoquer une variation de l'aimantation nucléaire (voir *b*) *figure 3*). A la fin de l'impulsion, le système est alors hors-équilibre et l'aimantation des spins tend à retrouver sa position initiale en présence de B_0 seul. Un retour à l'équilibre est observé (voir *c*) *figure 3*), s'accompagnant d'une émission d'onde électromagnétique détectable (signal observé), et qui est à la base du phénomène de résonance magnétique nucléaire, comme présenté ci-dessous, *figure 3*. L'enregistrement du signal commence à partir de la fin de l'impulsion perturbatrice. B_0 est très intense (9,7 Tesla pour le spectromètre utilisé lors de ce stage) et est obtenu grâce à des bobines supraconductrices refroidies à l'hélium liquide dans lesquelles circule un courant continu. Pour comparaison, les IRM cliniques offrent classiquement un champ B_0 de 1,5 ou 3T. B_1 est généré par l'application d'un courant sinusoïdal dans une antenne qui émet un champ électromagnétique d'axe perpendiculaire à B_0 .

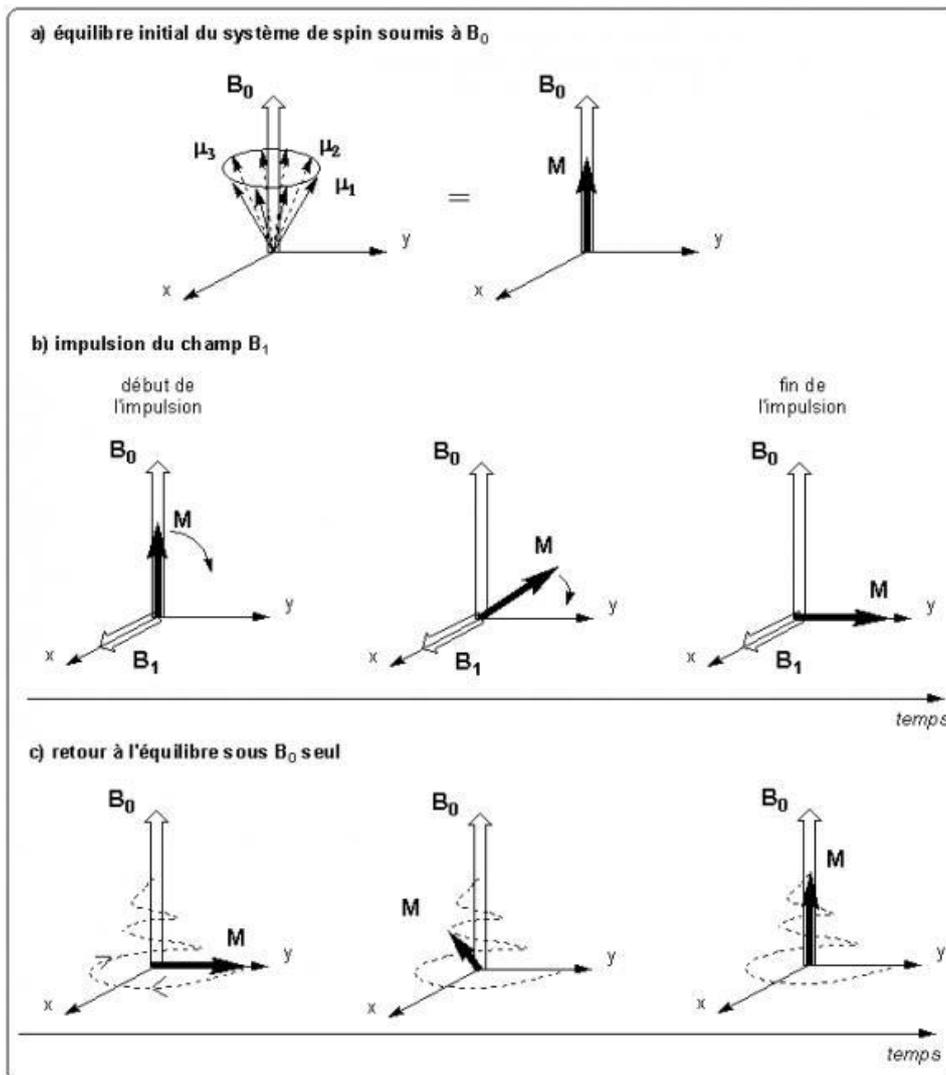


Figure 3 : Principe de la RMN

Le sel étant composé de chlorure et de sodium, il a donc fallu choisir à partir de quel noyau réaliser la spectroscopie RMN. Ce choix s'est porté sans hésitation sur le noyau sodium car c'est un noyau de spin non nuls, donc visible en RMN. Le sodium étant d'ailleurs un constituant important des tissus biologiques *in vivo*, il existe dans les laboratoires de RMN des antennes spécifiques pour son observation, c'est le cas à AgroResonance.

Ces expériences ont pour but de déterminer l'état de liaison des noyaux sodium à la matrice alimentaire. Pour cela, nous mesurons deux types de paramètres. Le premier est la présence ou non d'interactions dites « doubles quanta » (dq), correspondant aux interactions noyau-noyau. Le second est la mesure de plusieurs temps de relaxation et de la quantité de noyaux qui relaxent à chaque temps.

La relaxation correspond au retour à l'équilibre de l'aimantation tissulaire (voir *c) figure 3*). Elle s'accompagne d'une émission d'énergie sous la forme d'ondes radiofréquences qui constituent le signal enregistré en RMN. Elle se décompose en 2 phénomènes : la relaxation longitudinale, qui correspond à la repousse de la composante longitudinale, et la relaxation transversale, qui correspond à la chute de l'aimantation transversale (voir *figure 4*).

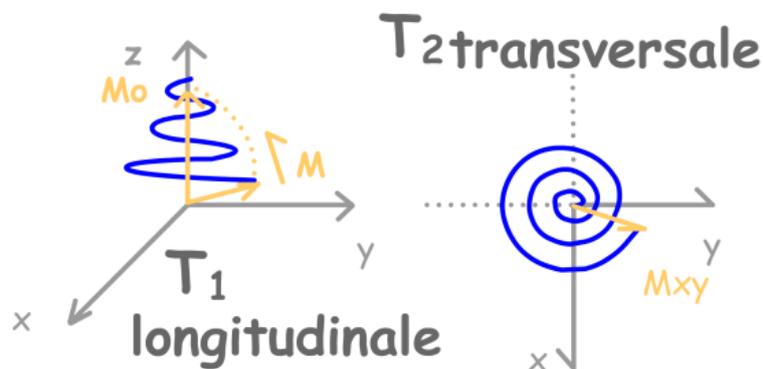


Figure 4 : Temps de relaxation

La repousse longitudinale correspond au retour au niveau de basse énergie ("parallèle") des spins excités (interactions spin-réseau). La croissance de l'aimantation longitudinale lors de la relaxation suit une courbe mono ou multi exponentielle. Elle est caractérisée par le ou les temps T1. Le T1 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63 % de sa valeur finale. Il est caractéristique des tissus et dépend de la mobilité des molécules où sont engagés les noyaux sodium.

La relaxation transversale est due au déphasage des spins : le déphasage est lié aux interactions spins-spins qui créent des hétérogénéités de champ. Les spins n'ayant pas exactement la même fréquence, ils se déphasent rapidement. Cette chute de l'aimantation transversale suit une courbe mono ou multi exponentielle décroissante caractérisée par le ou les temps T2. Le T2 correspond au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale. La relaxation transversale est beaucoup plus rapide que la relaxation longitudinale : T2 est toujours plus court ou égal à T1.

3.2.2. Spectromètre, antenne, chaîne électronique, prétraitement

Le spectromètre ici utilisé est un spectromètre 400 MHz, correspondant à un champ magnétique continu de 9,7 Tesla, de la gamme Ascend de la marque Burkert, illustré *figure 5*.

La conception de l'aimant (spectromètre) Ascend présente une technologie supraconductrice avancée, permettant la conception de bobines magnétiques plus petites. La technologie d'assemblage unique conduit à une stabilité de champ exceptionnelle et la suppression des perturbations externes fournit jusqu'à 99% d'efficacité de dépistage contre les perturbations du champ magnétique externe.

L'aimant supraconducteur est plongé dans de l'hélium liquide et entouré d'un vase de Dewar pour l'isolation thermique. Pour limiter l'évaporation de l'hélium, le tout est plongé dans un autre vase de Dewar encore plus grand et rempli d'azote liquide. Il est nécessaire d'assurer tous les 15 jours une mise à niveau de l'azote et 2 fois par an de l'hélium.

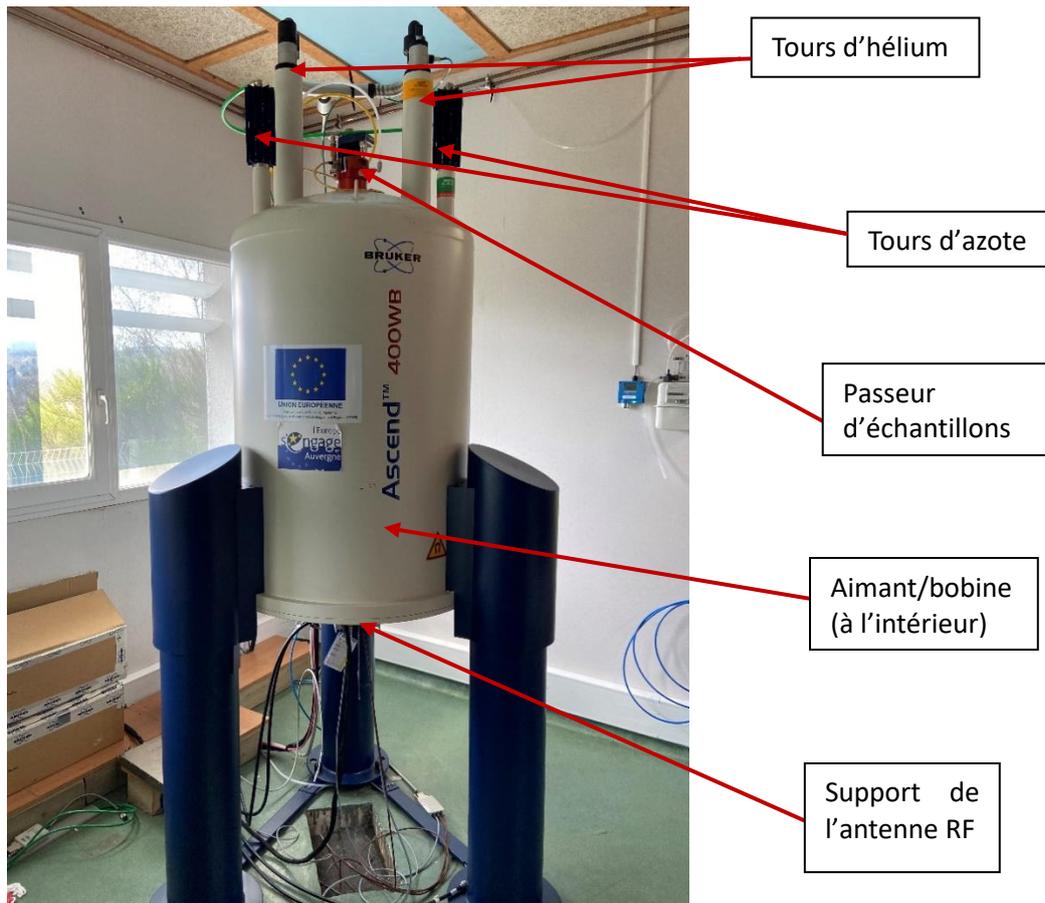


Figure 5 : Spectromètre 400 MHz utilisé

L'antenne est insérée par le bas du spectromètre. L'antenne ici utilisée possède 3 canaux de détection/excitation correspondant à trois fréquences différentes : le deutérium pour le lock (stabiliser le champ magnétique), le proton, et un noyau X (ici le sodium).

Ici, une sonde (ie, l'antenne) BBO 5mm est utilisée : Broad Band (large bande) et O, pour Observe, indique que les bobines X sont les plus proches de l'échantillon et les bobines proton sont à l'extérieur. Elle est donc particulièrement adaptée pour la spectroscopie du noyau X, ici le sodium. Les différents canaux de la sonde sont reliés à un préamplificateur posé à côté du spectromètre, représenté figure 6. La sonde peut se décomposer en deux parties : une partie de mesure, composée d'une bobine utilisée pour exciter les noyaux puis pour mesurer le signal RMN. La seconde partie de la sonde est constituée d'une électronique à ajuster pour que la bobine soit accordée au circuit d'alimentation et

donc la plus efficace possible (toute l'énergie est alors transmise à l'échantillon, il n'y a pas de réflexion).

La chaîne électronique de commande se compose d'un ordinateur sur lequel on « joue » une séquence particulière de RMN, d'amplificateurs de puissance, de convertisseurs numériques-analogiques et de détecteurs. L'ensemble de cette électronique a plusieurs rôles : dans un premier temps, elle sert à générer le signal d'excitation, aussi bien sa forme, que sa durée, son intensité ou sa fréquence (onde électromagnétique sous forme d'impulsion). Puis elle acquiert la réponse du système de spins (signal RMN) et l'amplifie.

Une fois amplifié, le signal induit capté par la bobine est appelé FID (Free Induction Decay). Il représente un ensemble de sinusoïdes amorties en fonction du temps. On applique (sous forme numérique) à cette réponse, qui est encore une fonction du temps, une opération mathématique appelée Transformée de Fourier. Cette dernière permet le passage d'une fonction dans le domaine temporel, à une fonction dans le domaine fréquentiel, permettant ainsi une exploitation du spectre, comme illustré *figure 7*.

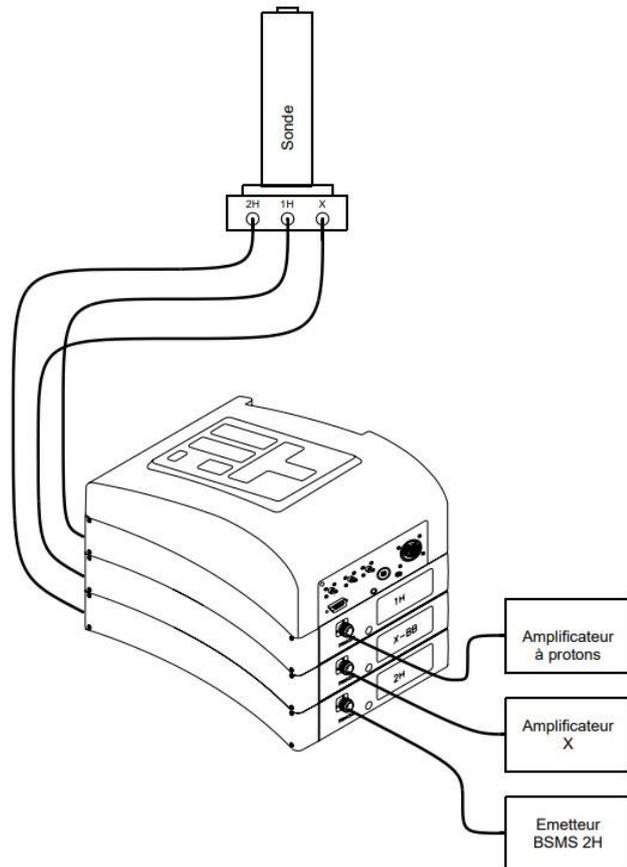


Figure 6 : Boîtier préamplificateur

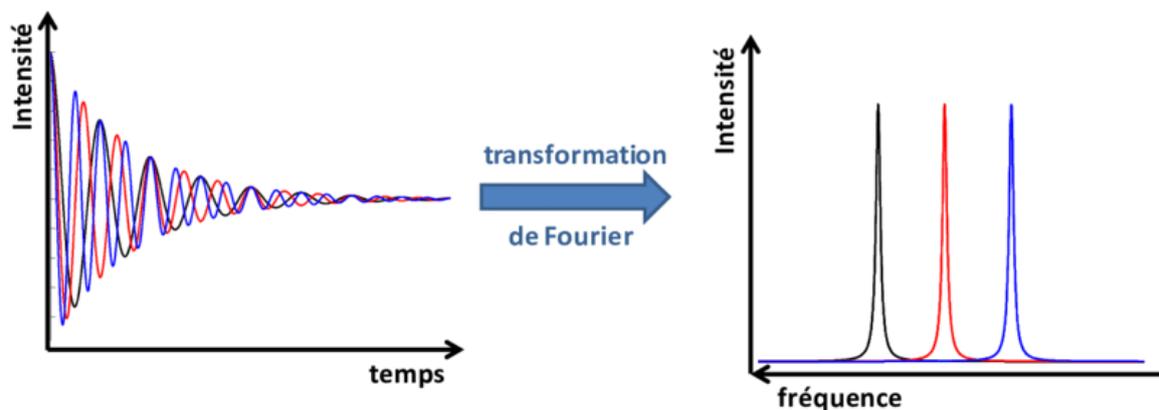


Figure 7 : Transformée de Fourier

La console est une armoire métallique, ventilée et protégée des parasites électromagnétiques, contenant toute l'électronique permettant de contrôler la sonde (excitation, détection, température, pression d'air comprimé, ...). Elle communique avec l'ordinateur via une connexion Ethernet. L'ordinateur est le point initial et final de la transmission de l'information. Il contrôle l'armoire électronique et reçoit les informations provenant de la sonde à travers toute l'électronique utilisée. Il centralise tout, y compris l'utilisation d'un passeur d'échantillons, représenté *figure 8*.



Figure 8 : Passeur d'échantillons du spectromètre

3.2.3. Protocoles de préparation des échantillons

Les échantillons préparés sont des carottes cuites dans de l'eau. Les paramètres de préparation variables sont présentés *figure 9* ci-dessous.



Purée de carotte



Carotte intègre



Salage dans
l'eau de cuisson



Salage à
l'assiette

Figure 9 : Paramètres variables de préparation des échantillons

Ces échantillons sont préparés avec une concentration en sel de 20 g/kg d'eau. Au départ trois concentrations devaient être étudiées : 5, 10 et 20 g/kg. Seulement, 5 et 10 g/kg étant des concentrations relativement faibles, les signaux étaient très bruités et difficiles à exploiter : leur SNR (signal to noise ratio= rapport signal sur bruit) était trop faible. En effet, plus la concentration en sel est faible, moins il y a de signal. Pour pallier ce manque de signal, il est possible en RMN d'accumuler plus de signal en rallongeant le temps d'acquisition. Pour considérer un traitement mathématique correct

du signal, il a été fixé que ce dernier doit posséder un SNR d'environ 200. En voulant avoir des temps d'acquisition adaptés aux attentes en terme de nombre d'échantillon analysé par jour, les SNR à 5 et 10 g/L sont insuffisants : respectivement 113 et 147, contre 250 pour 20 g/kg. C'est pour cela que les expériences se sont faites uniquement sur une concentration en sel de 20 g/kg.

Les carottes choisies sont sans pesticides et originaires de France. L'eau utilisée lors de la cuisson et de la préparation de la purée est de l'Evian. Le sel est un sel fin, iodé, de la marque La Baleine. La préparation des échantillons nécessite un protocole strict et précis, identique à celui réalisé par une autre équipe collaboratrice du projet.

Protocole de préparation de l'échantillon « purée de carottes cuites dans l'eau salée » :

- Eplucher les carottes de manière à avoir un diamètre de 2,2 cm +/-0,2 cm
- Couper les extrémités de manière à avoir une longueur de 10 cm +/-0,2 cm
- Répéter l'opération pour 3 carottes au total
- Mettre 1 kg d'eau Evian dans la casserole
- Peser 20 g de sel
- Faire bouillir l'eau à la température de la plaque maximale (240°C)
- Ajouter le sel puis les carottes
- Baisser la température à 100°C
- Lancer un chronomètre de 25 min
- Au bout de 5min, baisser la température à 80°C pendant 1min puis repasser à 100°C (pour limiter les pertes d'eau)
- Egoutter les carottes
- Retirer 0,5 cm de chaque extrémité
- Peser les carottes
- Peser une masse d'eau Evian : $m_{\text{eau}} = (m_{\text{carottescuites}} \times 50) / 159$
- Couper les carottes (pour faciliter le mixage)
- Mixer l'eau pesée une étape plus tôt et les carottes avec un mixeur avec une vitesse de 2 avec 15 coups de pression d'environ 1 s

Le calcul de la masse d'eau à rajouter a été déterminé le premier jour : pour 159g de carottes cuites, après ablation des extrémités, 50 g d'eau sont nécessaires pour obtenir une texture de purée convenable.

Les instruments de mesure ainsi utilisés sont une balance (pesée) ainsi qu'un pied à coulisse (diamètre des carottes).

Pour réaliser la spectroscopie RMN, l'échantillon doit ensuite être inséré dans un tube RMN très fin : 5mm de diamètre. La mise en tube peut alors s'avérer délicate. Pour la purée, elle est effectuée à l'aide d'une pompe à crémaillère (*figure 10*) et d'une pipette pasteur (*figure 10*). Afin de faire descendre l'échantillon au fond du tube RMN, il est parfois nécessaire d'utiliser un fil de fer fin (*figure 10*) pour venir percer légèrement l'échantillon, afin de pouvoir laisser s'échapper de l'air, et pouvoir pousser l'échantillon au fond. Cette étape est capitale car les détecteurs du spectromètre ne détectent qu'une partie du fond du tube. Si l'échantillon n'est pas correctement placé dans le tube, l'analyse n'aboutira pas car l'échantillon ne sera pas dans la zone active de l'antenne et il n'y aura aucun signal.

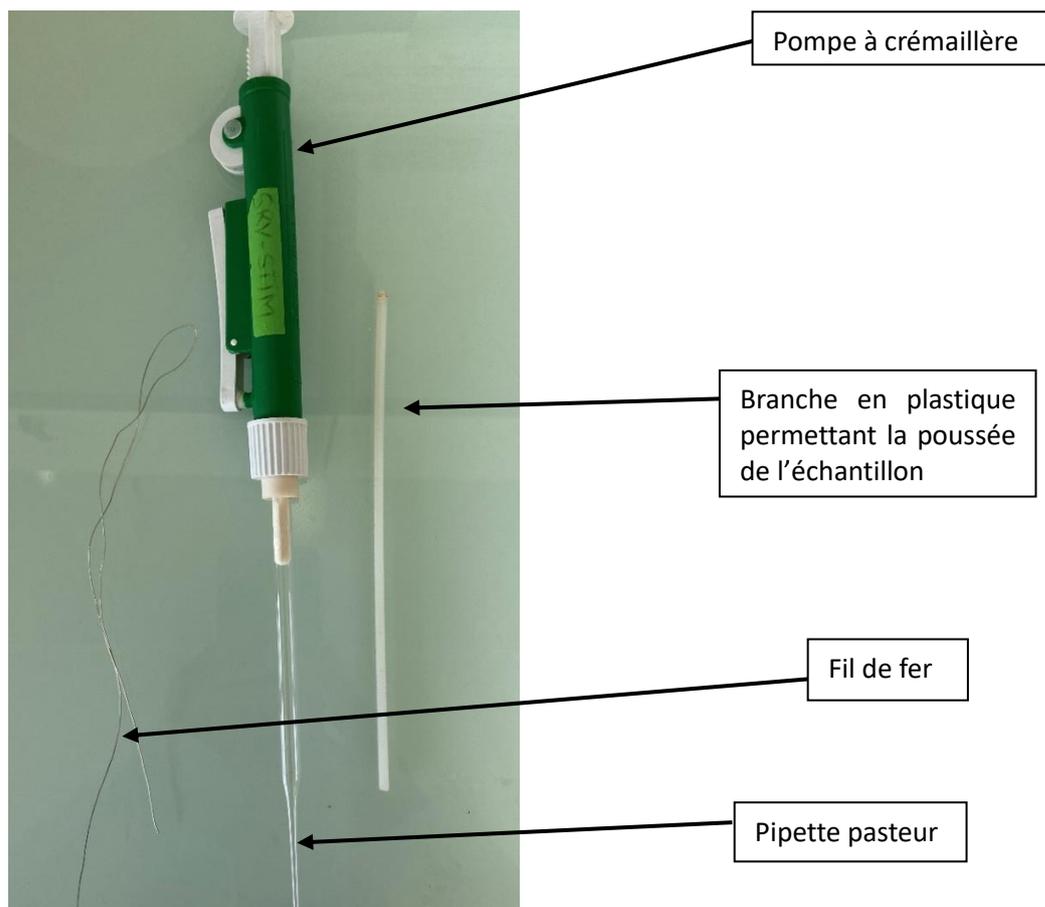


Figure 10 : Eléments nécessaires à la mise en tube de l'échantillon purée

Le protocole de préparation de l'échantillon « carotte entière cuite dans l'eau salée » est le même que celui de la purée, à quelques exceptions près :

- Une seule carotte utilisée
- Les pesées sont inutiles (car pas d'eau à rajouter)
- Pas de mixage
- L'échantillon est à prélever selon le diamètre de la carotte (de manière à avoir 2 bords et le cœur, comme représenté *figure 11*)

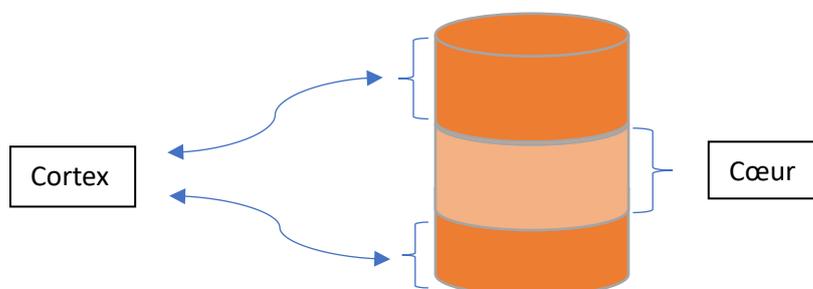


Figure 11 : Morceau de l'échantillon prélevé

Tous les autres protocoles complets sont décrits en annexe.

Pour la carotte entière, la mise en tube est effectuée à l'aide d'un tube en verre, les deux extrémités étant ouvertes en forme de cercle, ce qui permet de venir planter ce tube au niveau du diamètre de la carotte (voir *figure 12*), l'enfoncer pour récupérer l'échantillon et enfin le faire glisser dans le tube RMN. Deux morceaux de carotte sont utilisés. L'opération du fil de fer est ici obligatoire. En effet, la carotte entière ne laisse que très rarement passer de l'air, étant entièrement solide. Il est donc impossible d'enfoncer l'échantillon correctement sans passer par cette étape (l'échantillon s'échappe du tube si l'opération n'est pas réalisée).

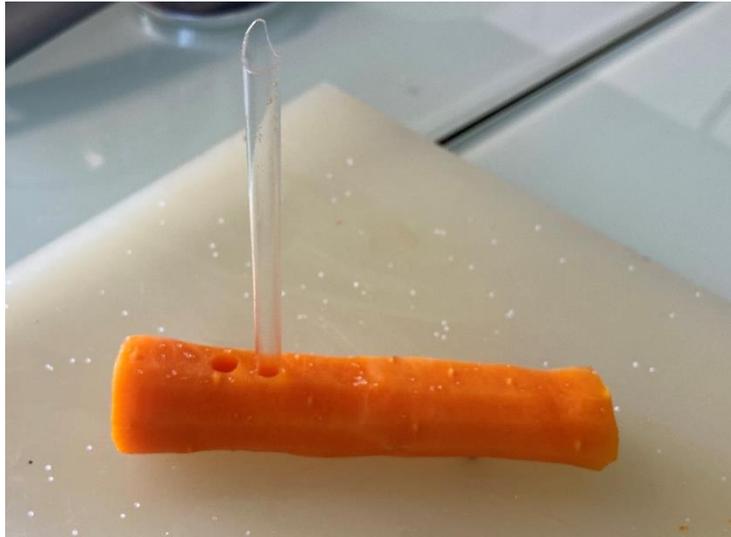


Figure 12 : Prélèvement d'un échantillon « carotte entière salée à l'assiette »

Le protocole de préparation de l'échantillon « carotte entière salée à l'assiette » est identique à ceux vus précédemment, hormis quelques différences :

- Pas d'ajout de sel dans l'eau pendant la cuisson
- Pesée de la carotte cuite
- Calcul de la masse de sel à ajouter à l'assiette : pour une quantité de sel semblable à 20 g/L dans l'eau, $m_{\text{sel}} = m_{\text{carottecuite}} \times 0,0064$

Lors de la mise en tube pour ce type d'échantillon, les deux morceaux de carottes doivent être placés de façon à ce que les deux extrémités salées soient l'une contre l'autre, au centre de la zone active de l'antenne, comme représenté *figure 13*.

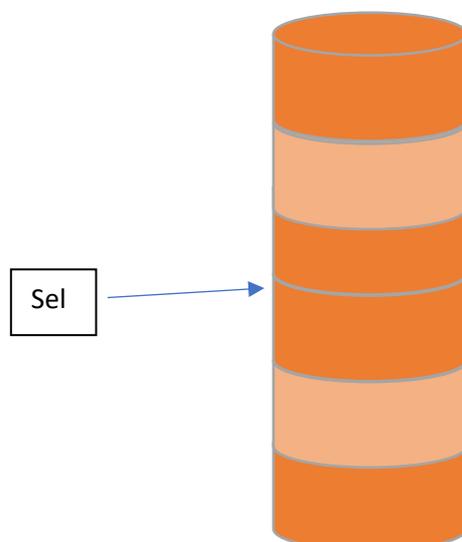


Figure 13 : Placement des morceaux de carotte dans le tube RMN

Pour la masse de sel à déterminer, une étude HPLC concernant la teneur en sel dans une carotte cuite à l'eau salée pour différentes concentrations a été réalisée par des partenaires du projet à Dijon. A partir de leurs données, nous avons pu alors déterminer une masse de sel à déposer sur la carotte pour avoir une quantité de sel présente dans la carotte semblable à celle présente dans une carotte cuite dans de l'eau salée à 2%.

Dans chaque cas, l'échantillon mis en tube est pesé et mesuré. Il est nécessaire que l'échantillon soit haut de 3cm minimum pour qu'il y ait du signal.

Sur la *figure 14* ci-après, le trait noir symbolise l'emplacement (approximatif) du passage des détecteurs de l'antenne. Pour notre antenne BBO 5mm, il s'agit du trait noir de gauche.

3.2.4. Protocoles d'acquisition au spectromètre

Une fois la mise en tube effectuée, la manipulation au spectromètre peut commencer.

Afin d'obtenir une bonne acquisition du signal, des réglages sont nécessaires pour tout changement d'échantillon. Il s'agit effectivement d'un protocole très précis. Tous les réglages et toutes les analyses se font sur le logiciel TopSpin 3.5 pl7.

Tout d'abord, l'échantillon est correctement placé dans un support appelé spinner (le tube doit toucher le fond de l'objet *figure 14*). Il est ensuite mis dans le passeur d'échantillons de l'appareil (voir *figure 8* page 9). Cette étape est possible grâce au mécanisme déclenché par une commande LIFT du logiciel, faisant ainsi sortir et entrer l'échantillon. LIFT ON permet d'éjecter l'échantillon de l'antenne. LIFT OFF replace lentement l'échantillon dans l'antenne, correctement positionné sur la zone active de la sonde (antenne) de mesure.

3.2.4.1. Réglages préalables

3.2.4.1.1. Le WOBB

Une fois le tube en place, il faut réaliser le WOBB en tapant la commande wobb dans TopSpin. Un signal faible est envoyé à la sonde de mesure et le coefficient de réflexion est mesuré en temps réel. L'accord de l'antenne consiste à faire varier manuellement le tune et le match en jouant sur les résistances et capacité d'un circuit RC pour annuler la réflexion à la fréquence de travail.

Cet accord s'effectue à l'aide des deux tirettes pour le sodium et des deux vis pour le proton, à la base de la sonde de mesure, en utilisant l'outil spécial fourni à cet effet. L'accord et l'adaptation ont une incidence l'un sur l'autre. Ils doivent être ajustés en parallèle.



Figure 14 : Objet permettant le bon ajustement de la hauteur du tube

La courbe obtenue constitue une mesure de l'amplitude du signal réfléchi (axe vertical) par rapport à la fréquence (axe horizontal). L'adaptation implique simplement l'ajustement de la sonde de mesure afin que le minimum de la courbe d'accord se situe en bas de l'affichage avec un pic de résonance le plus fin possible. L'accord en fréquence permet de s'assurer que cela correspond à la fréquence de transmission qui se situera au centre de l'échelle horizontale de l'écran. Ces deux réglages garantissent un minimum de réflexion du signal transmis. Cette étape est nécessaire pour deux bobines : celle du proton et celle du noyau X, ici noyau sodium.

3.2.4.1.2. Le shim

L'aimant génère le champ magnétique B_0 requis pour induire l'aimantation nécessaire à l'obtention d'un signal RMN. Pour que tous les noyaux d'un échantillon, par exemple les noyaux sodium, qui sont dans le même état de liaison donnent le même signal RMN, ils doivent tous être soumis au même B_0 . L'homogénéité du champ B_0 est donc également un prérequis. Le système de shims est un ensemble de bobines conductrices servant à compenser toute inhomogénéité existante. Les courants traversant ces shims sont commandés par le BSMS (Burker Smart Magnet control System) et peuvent être ajustés dans les directions x, y et z, et leurs combinaisons, depuis le clavier BSMS afin d'optimiser le signal RMN. Cela a un effet majeur sur la résolution et la sensibilité du signal.

Si le champ était parfaitement homogène, et notre échantillon constitué de noyaux ayant tous les mêmes états de liaison, le signal serait un pic de Dirac (courbe piquée verticalement en une valeur de fréquence donnée). Nos échantillons étant constitués de noyaux qui sont liés différemment à la matrice, on ne tend jamais vers un Dirac, mais on cherche les réglages de shim qui affinent le pic et maximise le signal. Dans la pratique, il est plus aisé de régler les shims en proton, ce que nous avons fait ici. Nous faisons donc l'hypothèse que si B_0 est homogène en proton, il l'est également en sodium.

3.2.4.1.3. Mesure de la fréquence de résonance (paramètre O1 sous TopSpin)

La fréquence de résonance s'obtient en réalisant une acquisition du spectre sodium. La valeur est à mesurer au sommet du pic et à reporter dans les séquences d'acquisition. Cette étape nous assure de travailler à la fréquence de résonance du sodium.

3.2.4.1.4. Réglage de la durée du pulse (paramètre p1 sous TopSpin)

Le p1 est la durée (en micro secondes) nécessaire pour l'impulsion du champ perturbateur B_1 pour que les spins basculent à 90° (pour ainsi obtenir le signal). Cette durée se détermine également grâce au spectre sodium. Il faut chercher la valeur de pulse pour laquelle le signal est le plus grand possible. Pour cela, on cherche d'abord la valeur du p1 pour laquelle le signal est le plus faible possible (correspondant alors à un alignement des spins à 180°). Une fois cette valeur déterminée, on la divise par deux : il s'agit alors du p1. Elle sera (tout comme le O1) à inscrire dans les paramètres de chaque acquisition.

3.2.4.2. Acquisition RMN

Une fois les réglages terminés, le lancement des acquisitions peut commencer. Trois types d'acquisitions sont réalisés.

La première est une acquisition qui permet de mettre en évidence la présence d'interactions double quanta (interactions noyau-noyau). Cette acquisition dure 5min.

La seconde est une CPMG. Cette acquisition permet d'obtenir les valeurs des temps de relaxation transversaux (T_2). Le signal obtenu est un pic dans le domaine fréquentiel et une décroissance mono ou multi exponentielle dans le domaine temporel. Cette décroissance est plus ou moins bruitée en fonction de la quantité de signal présent et de la durée d'acquisition (et donc d'accumulation du signal). Différentes durées d'acquisition ont été testées afin de trouver le meilleur compromis entre SNR et durée d'acquisition. Cette acquisition dure finalement 1h30.

La dernière est une analyse 2 dimensions. En effet, elle permet l'obtention des valeurs de T_2 (relaxation transversale), comme la CPMG, mais aussi des valeurs de T_1 (relaxation longitudinale). Elle apporte donc une information supplémentaire. Elle est en réalité la succession de plusieurs CPMG entrelacées avec des séquences dites « d'inversion d'aimantation » qui permettent, elles, de mesurer le ou les T_1 . Comme pour la CPMG, plusieurs essais de durée ont été effectués, avant de poser une durée définitive de 8h15. Cette analyse étant très longue, elle ne se fait que sur le dernier échantillon de la journée, afin de pouvoir avoir lieu durant la nuit.

3.2.5. Analyses des données

Le traitement de données s'effectue avec des programmes Matlab développés par les collègues de l'équipe. Dans un premier temps les données sont transférées de la console d'acquisition jusqu'au serveur de calcul Bacchus via un outil de transfert de données appelé Filezilla. Une fois les données sur Bacchus, un outil d'accès à distance sur ce serveur (X2Go) nous permet de lancer Matlab sur Bacchus et de profiter de la puissance de calcul de ce serveur pour effectuer les traitements. Les traitements consistent essentiellement à ajuster des fonctions bi ou multi exponentielles (dans ce second cas sans a priori du nombre d'exponentielles) sur nos données. Quand deux exponentielles coexistent, on a alors deux T_2 . Un premier, T_{2f} , f pour fast, puis un second, T_{2s} , s pour slow. Différentes versions des programmes Matlab ont été testées afin de traiter au mieux les données. L'écriture des programmes ne fait pas partie des missions de ce stage.

Un premier programme de traitement des CPMG est utilisé. Il s'agit d'une analyse discrète. Il cherche à ajuster sur les données, deux exponentielles. Peu importe le nombre d'exponentielles réellement présentes, il fera en sorte d'en tracer deux. Nous nous sommes aperçus en début de stage que l'ajustement n'est pas parfait. Un exemple de résultat est présenté *figure 15*.

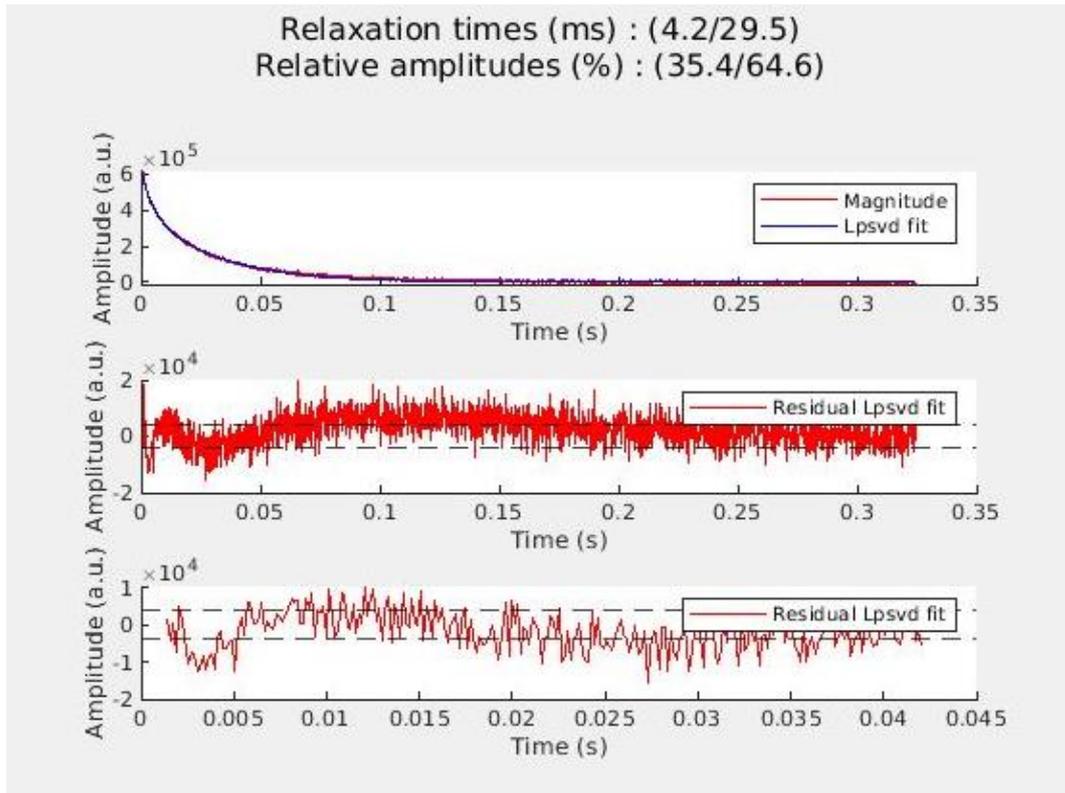


Figure 15 : Résultat en analyse discrète d'une CPMG d'une carotte intègre salée dans l'eau à 2%

La figure du haut représente la biexponentielle obtenue (en bleu) qui ajuste au mieux les données (en rouge).

La seconde figure, représente la différence entre le signal mesuré et l'ajustement obtenu. Si le modèle biexponentiel est correct, ce signal résiduel ne devrait théoriquement présenter que du bruit, c'est-à-dire que le résiduel devrait se trouver dans la zone entre les tirets. Or, ce n'est pas le cas, cela signifie qu'une autre composante (au minimum une troisième exponentielle) est présente dans nos données.

La troisième figure n'est qu'un zoom sur une partie du résiduel observé sur la deuxième figure. Ces résultats préliminaires ont montré que sur nos échantillons alimentaires, il existe plus de deux types de liaison des noyaux sodium et qu'une analyse multi exponentielle, sans a priori sur le nombre d'exponentielles, est nécessaire. Un exemple de résultat ainsi traité est présenté *figure 16*.

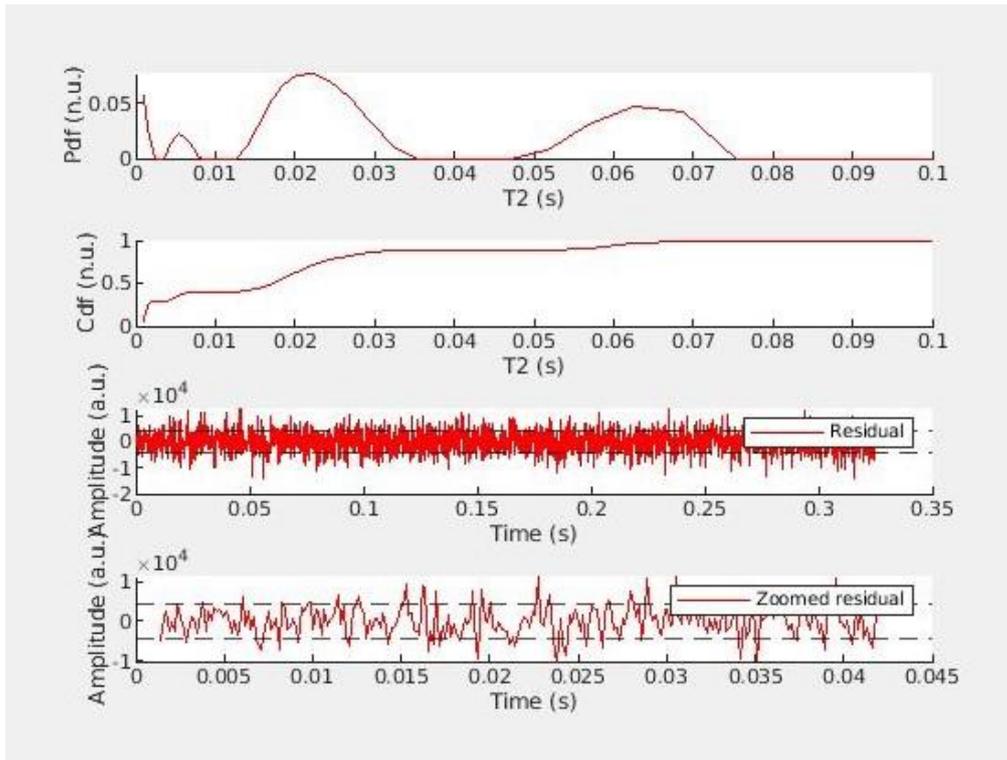


Figure 16 : Résultat en analyse continue d'une CPMG d'une carotte intègre salée dans l'eau à 2%

La composante qui était présente sur le résiduel en début d'acquisition précédemment disparaît. Cette méthode d'analyse est donc ici plus juste. Cependant, les figures affichent 2, 3 ou 4 T_2 différents (et un même nombre de A_2). L'interprétation est rendue plus difficile. Sur ce type de résultats, nous avons accès à n valeurs de T_2 et à n A_2 , A_{2i} étant la proportion de noyaux qui relaxent à la vitesse T_{2i} . Un tracé sur excel est nécessaire pour une mesure plus précise des T_2 et A_2 . Deux tracés sont exploités : un pour la mesure des T_2 (exemple *figure 17*), et un pour celle des A_2 (exemple *figure 18*).

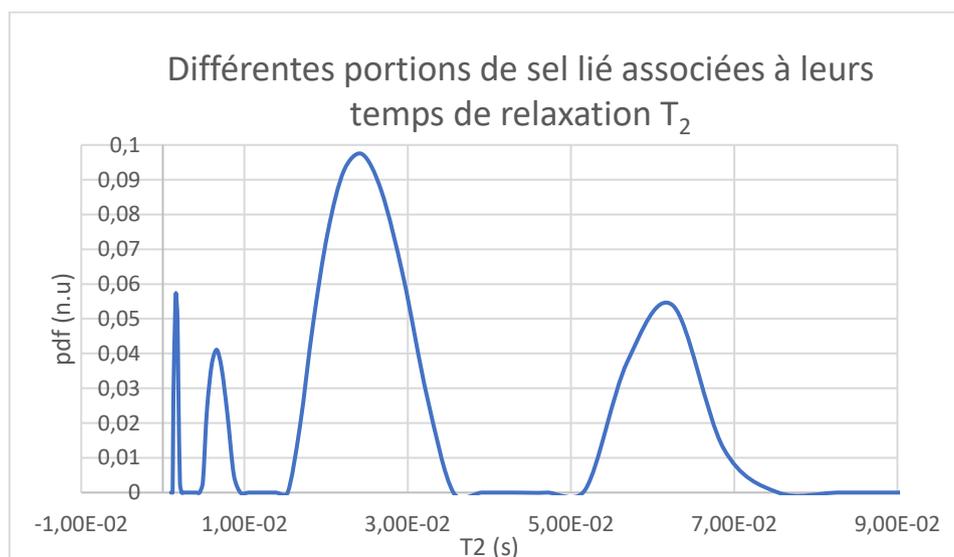


Figure 17 : Résultat d'une CPMG de 1h30 sur une carotte intègre salée dans l'eau pour les mesures des T_2 (axe des abscisses)

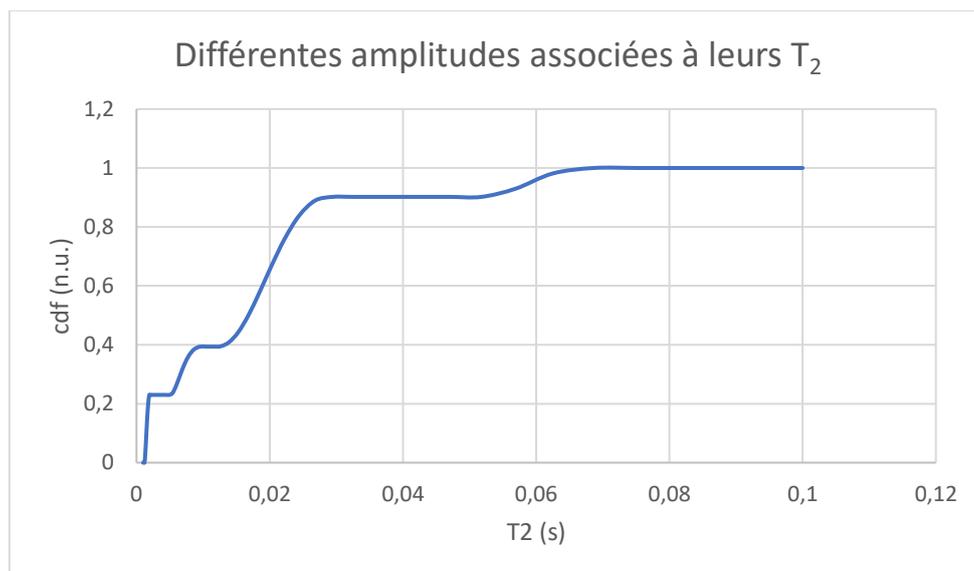


Figure 18 : Résultat d'une CPMG de 1h30 sur une carotte intègre salée dans l'eau pour les mesures des A_2 (axe des ordonnées)

Dans la suite de ce rapport, seuls les résultats obtenus avec cette dernière méthode, l'ajustement par une multi exponentielle, sans apriori, seront présentés.

3.2.6. Régulation en température

Un problème majeur est apparu au cours des expériences : la maîtrise de l'échantillon pendant les expériences RMN. Lors du lancement d'une CPMG, une légère augmentation de température a systématiquement lieu, du fait de l'apport d'énergie RF par les impulsions nécessaires à la séquence. En fonctionnement normale, la régulation en température permet de redescendre en une à deux minutes à 22°C et il n'y a alors aucune réelle incidence sur l'acquisition. Malheureusement, la régulation de la température à 22°C fonctionnait difficilement en journée en cas de forte chaleur. En effet, l'air permettant de réguler la température dans le spectromètre est issu de l'air extérieur. Les jours de forte chaleur, lors du lancement de l'acquisition, la température atteint 22,6°C et ne parvient plus à redescendre. Une solution technique a été mise en place : un système de refroidissement qui consiste à faire circuler l'air destiné à la régulation dans un bain d'eau refroidie dans un LAUDA avant de l'envoyer vers le spectromètre.

3.3. Résultats et interprétations

Après près de dix semaines de manipulations, des résultats se sont dessinés, et sont présentés et interprétés ci-dessous.

Les figures 19, 20, 21 représentent les distributions des différents temps de relaxation T_{2i} présents dans chaque type d'échantillons (intègre salée à l'assiette, intègre cuite dans l'eau salée et purée cuite dans l'eau salée). Le tableau 1 rassemble l'ensemble des résultats chiffrés : moyennes et écarts-types pour les T_{2i} et A_{2i} , les A_{2i} représentant la part relative de chaque population de noyaux relaxant avec les temps de relaxation T_{2i} .

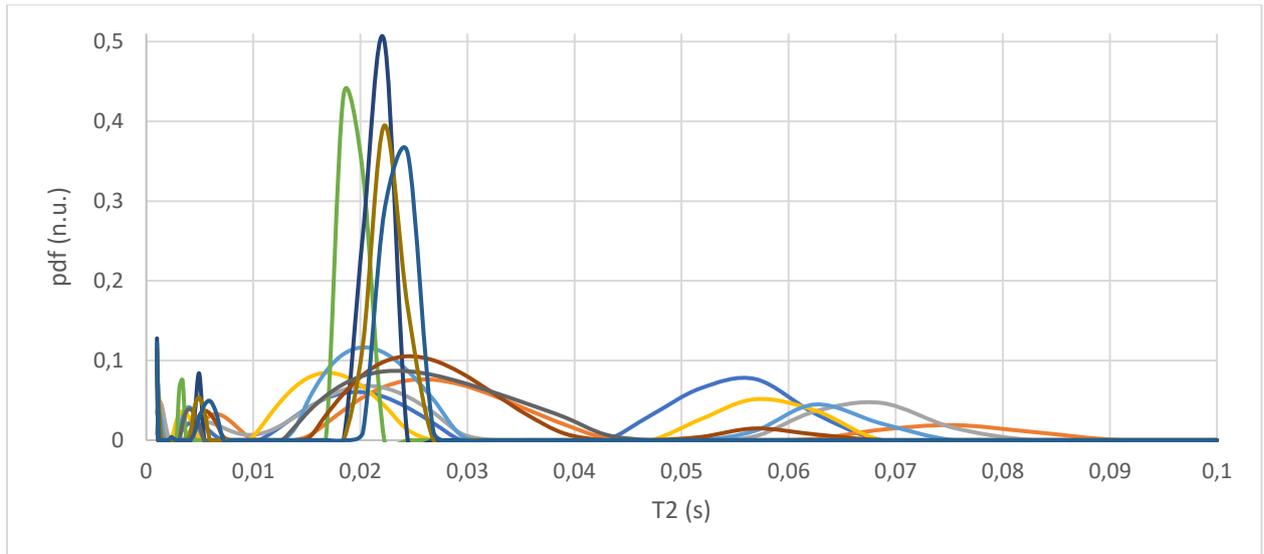


Figure 19 : Résultats de 11 répétitions de carottes intègres salées à l'assiette

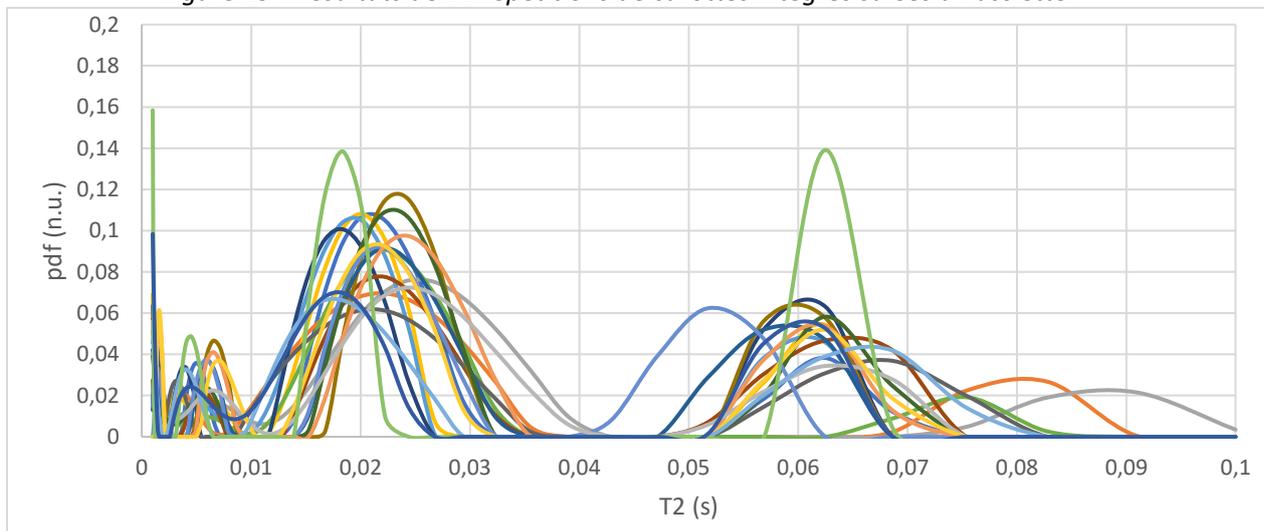


Figure 20 : Résultats de 19 répétitions de carottes intègres salées dans l'eau

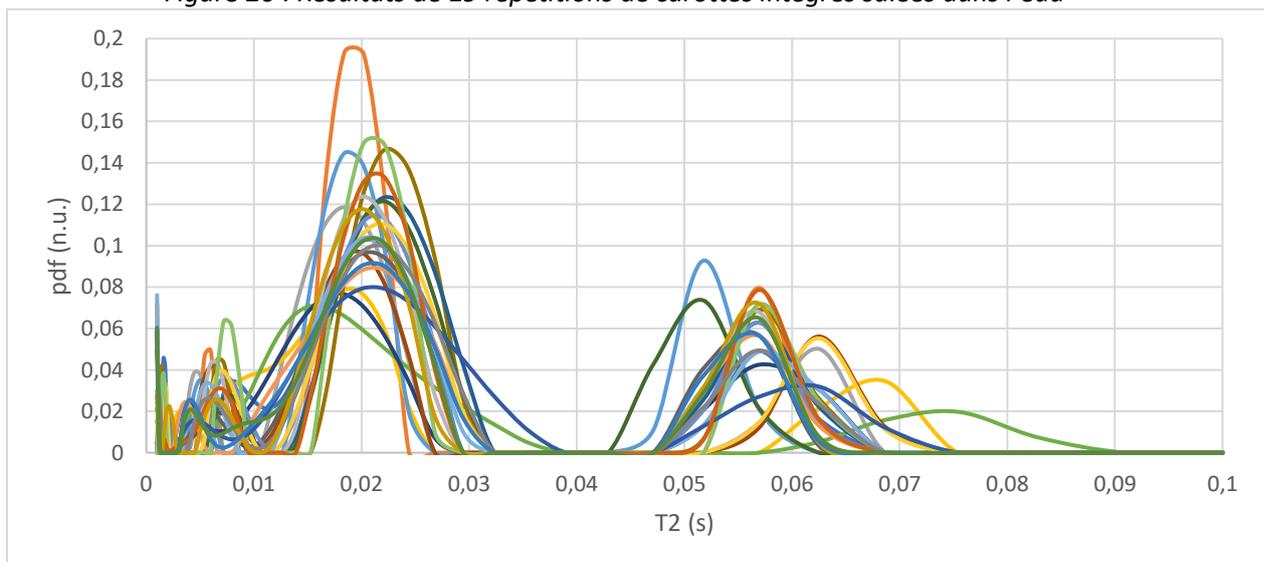


Figure 21 : Résultats de 24 répétitions de purées de carottes salées dans l'eau

Intègre assiette							
T₂₁ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₂ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₃ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₄ (ms)	Ecart-type (ms)
1,286	0,069	4,898	1,168	22,009	2,756	62,883	7,726
A₂₁	Ecart-type (ms)	A₂₂	Ecart-type (ms)	A₂₃	Ecart-type (ms)	A₂₄	Ecart-type (ms)
0,179	0,065	0,152	0,02	0,618	0,126	0,052	0,067
Intègre eau							
T₂₁ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₂ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₃ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₄ (ms)	Ecart-type (ms)
1,49	0,202	5,521	1,148	21,605	2,456	65,548	8,948
A₂₁	Ecart-type (ms)	A₂₂	Ecart-type (ms)	A₂₃	Ecart-type (ms)	A₂₄	Ecart-type (ms)
0,200	0,040	0,183	0,034	0,571	0,13	0,095	0,029
Purée eau							
T₂₁ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₂ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₃ (ms)	Ecart-type (ms)	T₂₄ (ms)	Ecart-type (ms)
1,624	0,365	6,055	1,432	20,627	1,727	58,670	5,040
A₂₁	Ecart-type (ms)	A₂₂	Ecart-type (ms)	A₂₃	Ecart-type (ms)	A₂₄	Ecart-type (ms)
0,109	0,028	0,171	0,037	0,626	0,051	0,094	0,021

Tableau 1 : Résultats finaux moyennant les T₂ des différentes types d'échantillons

A partir de ces données, il est possible de discuter plusieurs aspects : les différences de temps de relaxation en comparant les T_{2i} et les différences de répartition des différentes populations entre les différents T_{2i} en comparant les amplitudes A_{2i}. Pour chaque type d'échantillon, le nombre de pics et la dispersion des courbes nous donnent également des informations précieuses.

- Comparaison carotte entière salée à l'assiette versus salée dans l'eau (effet type de salage) : Les premiers temps de relaxation T₂₁ de la carotte entière salée à l'assiette par rapport à celles salées dans l'eau de cuisson (cases orangées) semblent être légèrement plus courts. Ce temps de relaxation très court est caractéristique de liaisons du sel plus fortes avec la matrice alimentaire. Le sodium semble donc être plus lié lorsqu'il est rajouté à l'assiette. En effet, plus les temps de relaxation sont courts, plus les liaisons sont fortes, moins le sel est libre et moins le goût salé sera présent, c'est du moins l'hypothèse que le projet Sal&Mieux souhaite vérifier. On remarque également en comparant les figures et les A₂₄ (cases bleues) qu'une part importante des échantillons salés à l'assiette (4 échantillons sur 11) ne présente que 3 pics. Cette disparition de la population la plus libre du sodium est propre à ce type d'échantillons salés à l'assiette. On peut imaginer que dans certains cas, le délai entre salage et RMN est trop court pour permettre une solubilisation des cristaux de sel. La prise en compte de ce délai dans l'analyse des données n'a pas eu le temps d'être faite dans mon stage mais sera faite par la suite.

- Comparaison carotte entière salée dans l'eau versus purée salée dans l'eau (effet structure de l'aliment) :

Les différences de temps de relaxation entre la purée et la carotte entière cuite dans l'eau salée semblent également différer : T₂₄ est légèrement plus long pour l'entière (cases vertes). Le sodium appartenant à cette population la plus libre semble donc être moins lié dans une carotte entière que dans la purée, les deux salées de la même manière (cuisson dans l'eau salée). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la nature même de la matrice alimentaire est très différente entre ces deux aliments (purée vs carotte). Enfin, cela signifie que le sel pourrait être perçu différemment dans l'aliment selon sa préparation.

Si les résultats d'analyse sensorielle réalisés au Centre des Sciences du Goût à Dijon en juin 2022 confirment que :

- L'entière salée à l'assiette donne un ressenti moins salé que l'entière salée à l'eau
- La purée salée à l'eau donne un ressenti plus salé que l'entière salée à l'eau

Nous pourrions alors conclure sur le fait que la nature des liaisons du sodium influence sur la perception salée. Cela permettra de donner des conseils d'usage domestique du sel : un consommateur devrait privilégier une cuisson de ses carottes dans de l'eau salée et ensuite les cuisiner en purée. Pour une même quantité de sel, il ressentira d'avantage son goût dans la purée cuite dans l'eau salée, que dans

une carotte entière cuite dans l'eau salée, et encore moins dans une carotte entière salée à l'assiette. Moins ressentir le goût attendu, c'est vouloir en rajouter, et ainsi augmenter son apport en sodium, alors qu'il suffit simplement de changer sa manière de l'utiliser.

4. Conclusion et perspectives

Pour conclure, cette étude a permis de montrer qu'il existe des différences de liaisons des noyaux sodium à la matrice de l'aliment carotte suivant la nature du salage (eau vs assiette) et suivant la nature de la préparation (intégrale, vs purée, pour un salage eau). Toutefois, les différences sont faibles et pour avoir des résultats plus robustes, l'analyse des données va se poursuivre après ce stage. En effet, la prise en compte des paramètres dont il est connu que la variation joue sur le spectre RMN acquis (délai entre salage et RMN, poids de la carotte à la cuisson, origine des carottes, durée du pulse d'excitation p1, décalage en fréquence O1) sera entreprise à la suite de mon stage par un élève ingénieur chimiste. Les résultats du projet Sal&Mieux sont importants car ils montreront si notre consommation de sel peut être réduite en optimisant notre manière de cuisiner et d'assaisonner. Pour ce qui est de la carotte, la nature des liaisons des noyaux sodium est différente à la fois en fonction du moment du salage et de la structure de l'aliment :

- Un salage à l'assiette renforce les liaisons les plus fortes (T_2 le plus court encore plus court)
- La déstructuration en purée diminue le T_{24} du sodium le plus libre

Le paramètre de la localisation du sel dans l'aliment est également important. Sa caractérisation n'était pas au programme de mon stage, mais il est connu que le sel est ressenti plus fortement s'il est distribué de façon hétérogène dans l'aliments. Ceci pourrait moduler notre conclusion sur le salage à l'assiette, car, de par sa préparation, la répartition en sel est forcément plus hétérogène. Il est possible également que l'effet localisation soit prépondérant sur l'effet liaison. Dans la carotte entière, ce sont dans les bords (le cortex) que le sel pénètre le plus. Ceci est peut-être dû au fait que le cœur est plus compact et solide mais surtout au fait que pour atteindre le cœur, le sel doit d'abord diffuser à travers le cortex. Donc, lors de la cuisson de carottes dans de l'eau salée, le sel va entrer dans la matrice alimentaire du légume et se répartir différemment selon les zones. Le cortex sera plus salé tandis que le cœur le sera moins. La figure ci-dessous est une IRM du sodium qui a été obtenue préalablement à mon stage, sur une carotte cuite à l'eau salée. On observe qu'il y a effectivement plus de sodium, donc de sel, dans le cortex.

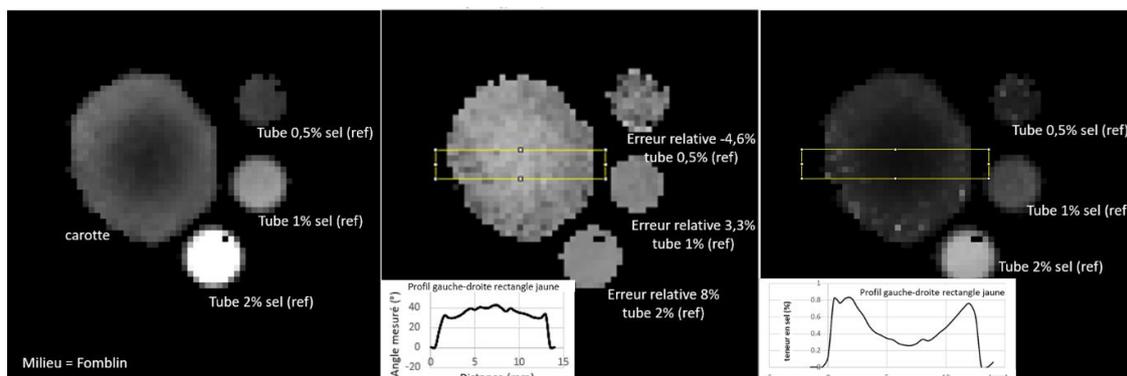


Figure 22 : IRM du sodium dans une carotte

Ces résultats ne donnent donc pas de solutions définitives et exhaustives quant au problème d'apport en sodium trop élevé dû à l'assaisonnement ou aux préparations culinaires du quotidien, mais ils permettent malgré tout de prendre conscience que la manière de saler influence la qualité gustative de ce dernier, pouvant alors nous amener à réduire la quantité finale de sel ingérée par le corps.

Liste des figures

Figure 1 : Logo de l'Institut.....	3
Figure 2 : Logo de l'unité QuaPA.....	4
Figure 3 : Principe de la RMN.....	6
Figure 4 : Temps de relaxation.....	7
Figure 5 : Spectromètre 400 MHz utilisé.....	8
Figure 6 : Boîtier préamplificateur.....	9
Figure 7 : Transformée de Fourier.....	9
Figure 8 : Passeur d'échantillons du spectromètre.....	10
Figure 9 : Paramètres variables de préparation des échantillons.....	10
Figure 10 : Eléments nécessaires à la mise en tube de l'échantillon.....	12
Figure 11 : Morceau de l'échantillon prélevé.....	12
Figure 12 : Prélèvement d'un échantillon « carotte intègre salée à l'assiette ».....	13
Figure 13 : Placement des morceaux de carotte dans le tube RMN.....	13
Figure 14 : Objet permettant le bon ajustement de la hauteur du tube.....	14
Figure 15 : Résultat en analyse discrète d'une CPMG d'une carotte intègre salée dans l'eau à 2%.....	17
Figure 16 : Résultat en analyse continue d'une CPMG d'une carotte intègre salée dans l'eau à 2%...	18
Figure 17 : Résultat d'une CPMG de 1h30 sur une carotte intègre salée dans l'eau pour les mesures des T_2 (axe des abscisses).....	18
Figure 18 : Résultat d'une CPMG de 1h30 sur une carotte intègre salée dans l'eau pour les mesures des A_2 (axe des ordonnées).....	19
Figure 19 : Résultats de 11 répétitions de carottes intègres salées à l'assiette.....	20
Figure 20 : Résultats de 19 répétitions de carottes intègres salées dans l'eau.....	20
Figure 21 : Résultats de 24 répétitions de purées de carottes salées dans l'eau.....	20
Figure 22 : IRM du sodium dans une carotte.....	22

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats finaux moyennant les T_2 des différents types d'échantillons	21
--	----

Glossaire

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Spin : propriété interne d'une particule, représentant son moment angulaire intrinsèque

Supraconducteur : absence de résistance électrique en dessous d'une certaine température critique

Relaxation : retour à l'équilibre de l'aimantation des spins nucléaires

FID : Free Induction Decay, signal enregistré capté par la bobine

Transformée de Fourier : fonction mathématique permettant la conversion d'un signal en domaine temporel vers un domaine fréquentiel

SNR : signal to noise ratio = rapport signal sur bruit

WOBB : réglage garantissant un minimum de réflexion du signal transmis ainsi que de s'assurer que la fréquence corresponde à celle de transmission

SHIM : homogénéisation du champ magnétique (pour induire les transitions RMN)

BSMS : Bruker Smart Magnet control System, commande depuis l'ordinateur de la salle de spectroscopie

O1 : fréquence de résonance (propre à chaque échantillon)

P1 : durée de la pulsation du rayonnement émis (perturbateur)

CPMG : acquisition permettant la mesure de différents temps de relaxation transversaux (T_2)

Double quanta : interaction noyau-noyau

Bibliographie

2. Présentation de l'entreprise :

Document de présentation du Centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes disponible sur :
<https://www.inrae.fr/sites/default/files/pdf/Plaque%20Centre%20Clermont%202020.pdf>

3. Etude expérimentale

3.1. Projet Sal&Mieux :

Présentation du projet disponible sur :
<https://www6.inrae.fr/saletmieux/>

3.2. Manipulations

3.2.1. Principe :

Figure 3 : Principe de la RMN, disponible sur :
<https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/les-origines-de-l-irm-la-resonance-magnetique>

Figure 4 : Temps de relaxation, disponible sur :
https://uel.unisciel.fr/chimie/spectro/spectro_ch03/co/apprendre_ch3_11.html

3.2.2. Spectromètre :

Figure 6 : Boîtier préamplificateur disponible sur :
http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/BASHCD10/pdf/z31633f_03.pdf

Figure 7 : Transformée de Fourier, disponible sur :
https://www.researchgate.net/figure/Illustration-dun-signal-de-precession-libre-contenant-3-frequences-en-realite-le_fig4_326080566

Annexes

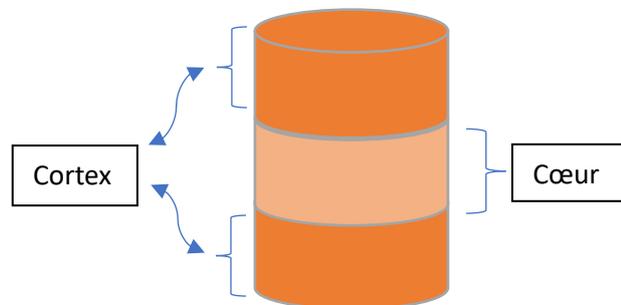
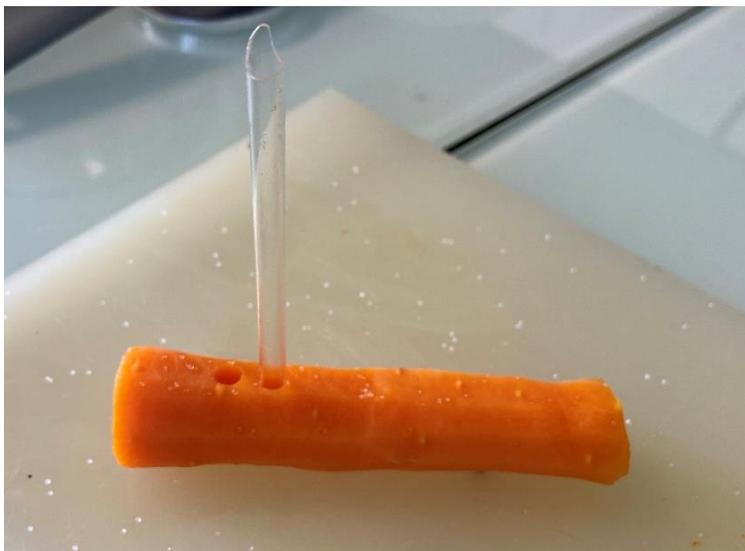
Annexe 1 : Protocole de préparation d'un échantillon de carotte entière salée dans l'eau

Préparation de l'échantillon :

- Couper les extrémités de la carotte de manière à avoir une longueur de 10 cm +/- 0.2 cm
- L'éplucher de façon à avoir un diamètre de 2.2 cm +/- 0.2 cm
- Mettre 1 kg d'eau Evian dans une casserole
- Peser 20 g de sel (pour une concentration de 20 g/kg)
- Faire bouillir l'eau (réglage de la plaque à 240°C)
- Ajouter le sel puis baisser la température de la plaque à 100°C
- Ajouter la carotte
- Cuire pendant 25min
- Cinq minutes après l'ajout de la carotte, baisser la température à 80°C pendant une minute, puis repasser à 100°C jusqu'à la fin de la cuisson
- Une fois les 25min écoulées, égoutter la carotte
- Retirer 0.5 cm de chaque extrémité

Prélèvement de l'échantillon :

- Planter le tube en verre coupé en ces deux extrémités (diamètre d'un tube RMN) selon le diamètre de la carotte, puis le retirer
- Placer ce tube au-dessus du tube RMN
- Pousser le bout de carotte à l'aide du bâtonnet en plastique
- Une fois le bâtonnet retiré, insérer le fil de fer de manière à laisser s'échapper de l'air (trouer l'échantillon)
- Pousser de nouveau l'échantillon avec le bâtonnet
- Répéter l'opération jusqu'à ce que le morceau atteigne le fond du tube
- Recommencer un autre prélèvement et suivre ce même mode opératoire
- Coller le deuxième morceau de carotte au premier



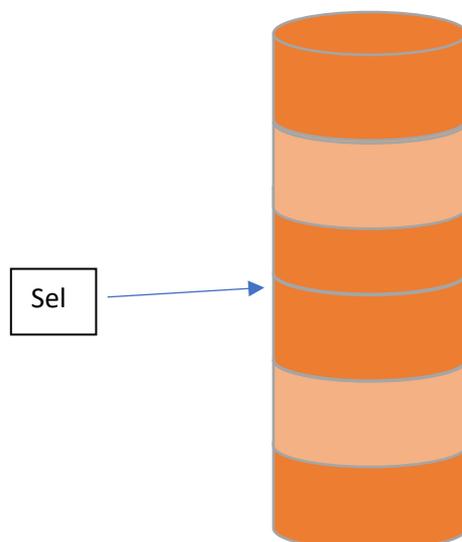
Annexe 2 : Protocole de préparation d'un échantillon de carotte intègre salée à l'assiette

Préparation de l'échantillon :

- Couper les extrémités de la carotte de manière à avoir une longueur de 10 cm +/- 0.2 cm
- L'éplucher de façon à avoir un diamètre de 2.2 cm +/- 0.2 cm
- Mettre 1 kg d'eau Evian dans une casserole
- Faire bouillir l'eau (réglage de la plaque à 240°C)
- Ajouter la carotte
- Baisser la température à 100°C
- Cuire pendant 25min
- Cinq minutes après l'ajout de la carotte, baisser la température à 80°C pendant une minute, puis repasser à 100°C jusqu'à la fin de la cuisson
- Une fois les 25min écoulées, égoutter la carotte
- Peser la carotte
- Peser une masse de sel : $m_{\text{sel}} = m_{\text{carotte}} \times 0,0064$ (pour une proportion de sel pénétrant dans la carotte similaire à celle pénétrant dans une carotte cuite dans de l'eau salée à 2%)
- Saupoudrer la carotte avec le sel pesé de manière relativement homogène

Prélèvement de l'échantillon :

- Planter le tube en verre coupé en ces deux extrémités selon le diamètre de la carotte, puis le retirer
- Placer ce tube au-dessus du tube RMN
- Pousser le bout de carotte à l'aide du bâtonnet en plastique, la partie salée au-dessus
- Une fois le bâtonnet retiré, insérer le fil de fer de manière à laisser s'échapper de l'air (trouer l'échantillon)
- Pousser de nouveau l'échantillon avec le bâtonnet
- Répéter l'opération jusqu'à ce que le morceau atteigne le fond du tube
- Recommencer un autre prélèvement
- Pour ce deuxième morceau, pousser la carotte dans le sens contraire de l'autre, c'est-à-dire la partie salée en dessous, de façon à ce que les deux parties salées soient collées dans le tube



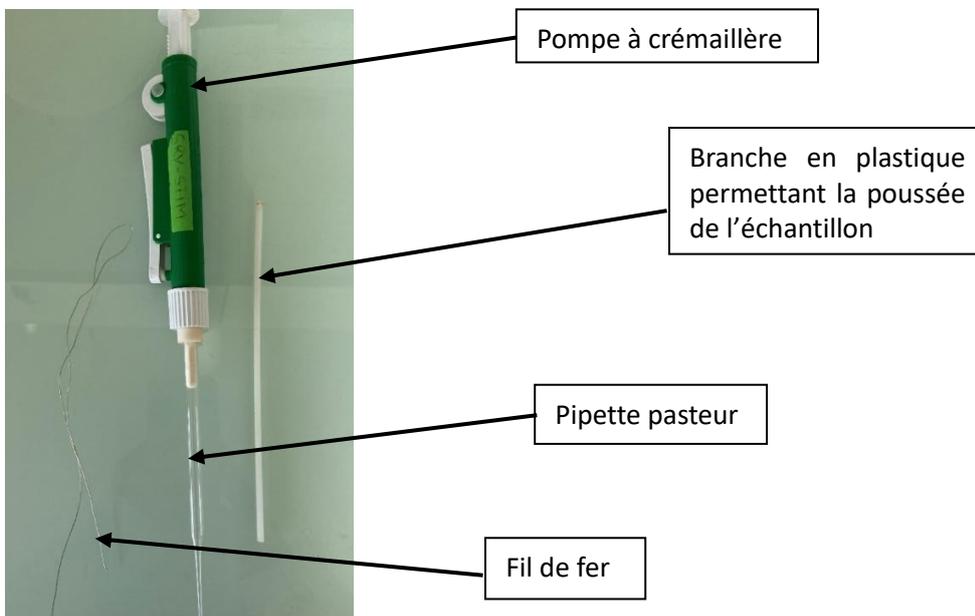
Annexe 3 : Protocole de préparation d'un échantillon de purée de carottes cuites dans l'eau salée

Préparation de l'échantillon :

- Eplucher les carottes de manière à avoir un diamètre de 2.2 cm +/-0.2 cm
- Couper les extrémités de manière à avoir une longueur de 10 cm +/-0.2 cm
- Répéter l'opération pour 3 carottes au total
- Mettre 1 kg d'eau Evian dans la casserole
- Peser 20 g de sel
- Faire bouillir l'eau à la température de la plaque maximale (240°C)
- Ajouter le sel puis les carottes
- Baisser la température à 100°C
- Lancer un chronomètre de 25 min
- Au bout de 5min, baisser la température à 80°C pendant 1min puis repasser à 100°C (pour limiter les pertes d'eau)
- Egoutter les carottes
- Retirer 0,5 cm de chaque extrémité
- Peser les carottes
- Peser une masse d'eau Evian : $m_{\text{eau}} = (m_{\text{carottescuites}} \times 50) / 159$
- Couper les carottes (pour faciliter le mixage)
- Mixer l'eau pesée une étape plus tôt et les carottes avec un mixeur avec une vitesse de 2 avec 15 coups de pression d'environ 1 s

Prélèvement de l'échantillon :

- Couper (ouvrir) une pipette pasteur à mi-hauteur
- L'insérer dans la pompe à crémaillère
- Aspirer la purée
- La faire descendre/couler dans le tube RMN
- Secouer le tube afin de faire glisser la purée au fond
- Répéter l'opération jusqu'à avoir un échantillon d'au moins 3 cm de hauteur dans le tube



Annexe 4 : Protocole d'acquisition des données sous TopSpin 3.5 pl7

- 1) Insertion de l'échantillon dans le spectromètre
 - Mettre le tube dans un spinner et ajuster sa hauteur à l'aide de l'outil dédié
 - Ouvrir la fenêtre de commande de la BSMS en tapant dans la ligne de commande « bsmsdisp »
 - BSMS : cliquer sur le bouton LIFT pour démarrer le flux d'air et faire sortir l'échantillon puis déposer le nouveau tube au sommet de l'aimant. L'échantillon restera en haut tant que le flux d'air sera présent
 - BSMS : cliquer de nouveau sur LIFT pour couper le flux d'air et faire descendre l'échantillon

- 2) Réalisation de l'accord (wobb) et du réglage de l'homogénéité du champ magnétique (shims)
 - A partir d'un jeu de données précédent, faire glisser une acquisition 'zg proton' du navigateur dans la fenêtre principale puis la dupliquer : ctrl + n
 - La nommer (et la numéroter ainsi que le numéro d'échantillon) : date_dev_type_pourcentage
 - Faire glisser ce zg pour ouvrir cette nouvelle expérience
 - Taper dans la ligne de commande « wobb » puis entrée :
 - Régler l'accord du proton (il faut centrer le pic sur la ligne verticale rouge et le pic le plus proche de zéro) à l'aide des vis T & M de couleur jaune situées sous la sonde. Pour cela, il faut soit regarder l'écran du PC soit s'aider du préamplificateur : un minimum de LED vertes doit être allumé
 - Appuyer sur l'icône permettant de changer de noyau (à côté de 'stop')
 - Répéter l'opération de réglage de l'accord pour le sodium en utilisant les réglettes 'Tuning' et 'Matching'
 - Une fois les réglages terminés, appuyer sur 'stop'
 - Taper « zg » puis entrée pour lancer l'acquisition
 - Une fois l'acquisition terminée, taper « ft » puis entrée pour réaliser l'atransformée de Fourier
 - Cliquer sur 'process', puis 'adjust phase'
 - Ajuster la phase du pic (pic montant, symétrie) à l'aide de la touche avec une double flèche (haut/bas) qu'il faut maintenir en clique droit, et ensuite déplacer la souris vers le haut et vers le bas jusqu'à l'obtention d'un bon pic
 - Cliquer sur l'icône enregistrer (disquette)
 - Taper « gs » puis entrée pour lancer l'acquisition en continue sans enregistrer les données. Cette opération va nous servir à régler l'homogénéité du champ magnétique
 - BSMS : ajuster les valeurs de z^3 , z^2 , z , x , y pour avoir le pic le plus fin et symétrique possible et qui maximise le signal (aire la plus grande) :
 - Taper « wsh » permet d'enregistrer ces réglages
 - Taper « rsh » permet de sélectionner un réglage préenregistré
 - Une fois les réglages terminés, appuyer sur 'stop'

- 3) Réglages des paramètres pour les acquisition RMN sodium
 - Faire glisser une acquisition zg sodium puis la dupliquer : ctrl + n
 - La nommer (et la numéroter ainsi que le numéro d'échantillon) : date_dev_type_pourcentage
 - Faire glisser ce zg
 - Taper « zg » puis entrée
 - Taper « ft » puis entrée
 - Ajuster les phases comme vu précédemment (process, adjust phase)
 - Réaliser l'excitation à la fréquence de résonance du signal
 - Zoomer sur le sommet du pic
 - Appuyer sur l'icône avec une flèche rouge montante
 - Appuyer sur le sommet du pic
 - Noter la valeur de O1
 - Calibrer la durée de l'impulsion RF

- Vérifier la valeur de la puissance de l'impulsion en tapant « plw1 » dans la ligne de commande. Cette valeur doit être proche de 50W
 - Taper « gs » puis entrée
 - Taper « p1 » puis entrée
 - Doubler la valeur affichée
 - Chercher la valeur qui rend le signal nul (ou très faible, symétrique par rapport à l'horizontal)
 - Diviser cette valeur par deux, puis l'attribuer à p1
 - Noter la valeur de p1
- 4) Réaliser l'expérience CPMG
- Faire glisser une CPMG puis la dupliquer : ctrl +n
 - La nommer (et la numéroter ainsi que le numéro d'échantillon) : date_dev_type_pourcentage
 - Aller dans les paramètres d'acquisition, puis dans l'icône en forme de pulse
 - Appliquer les valeurs précédemment déterminées de O1 et p1
 - Taper « zg » puis entrée
- 5) Autres acquisitions sodium
- Répéter les mêmes modes opératoires que dans la partie 4) pour toutes les autres acquisitions en choisissant la bonne expérience

Annexe 5 : Références du matériel utilisé

- Mixeur : Moulinex Mixeur Easychef Mixeur à Main 450 W 2 Vitesses Lames Zelkrom Blanc DD451110
- Plaque de cuisson : Réchaud induction Essentielb EPI 1 Réf : 8009169 (chez boulanger)
- Casserole : Casserole 18 cm Carrefour Home
- Eau : Evian
- Carottes : Le Marché (France, sans pesticides), La Belle du Jardin (Portugal, sans pesticides), en vrac (France, sans pesticides)

Résumé

Durant ces onze semaines, mes recherches avaient pour but de contribuer au projet collaboratif *Sal&Mieux*. L'objectif de ce projet est l'optimisation et la limitation de l'utilisation du sel discrétionnaire, tout en le rendant plus efficace pour maintenir le goût salé et l'appréciation des aliments. Ma mission était de caractériser l'état de liaison du sel dans la carotte, préparée et salée de différentes manières, par spectroscopie RMN du noyau sodium. Grâce aux acquisitions réalisées sur un grand nombre d'échantillons, les valeurs des temps de relaxation transversaux de chacun d'eux ont pu être déterminées. La comparaison des temps de relaxation entre type d'échantillons permet de faire émerger des tendances. Le premier temps de relaxation est légèrement plus court pour une carotte intègre salée à l'assiette plutôt que pour une carotte intègre salée dans l'eau de cuisson. Ce temps très court est caractéristique de liaisons du sel plus fortes avec la matrice alimentaire. Le sodium est donc d'autant plus lié lorsqu'il est rajouté à l'assiette. Le temps de relaxation le plus long est légèrement plus long pour une carotte intègre cuite dans l'eau salée que pour une purée de carottes, salées de la même manière. La nature même de la matrice alimentaire, très différente entre ces deux types d'aliments (purée vs carotte), pourrait expliquer cette différence. Le sel pourrait donc être perçu différemment dans l'aliment selon le type de salage et la structure de l'aliment. Des analyses sensorielles, réalisées par les partenaires du projet en juin 2022, confirmeront ou infirmeront nos interprétations : la nature des liaisons du sodium influe sur la perception salée. Les résultats finaux de ce projet montreront si notre consommation de sel peut être réduite en optimisant notre manière de cuisiner et d'assaisonner. Cependant, les différences entre ces temps de relaxation restent faibles. Pour renforcer la fiabilité de ces résultats, il faut acquérir plus de données et mettre en œuvre une analyse statistique plus poussée.

Mots-clés : sel, spectroscopie RMN, noyau sodium, liaison, temps de relaxation

Summary

During these eleven weeks, my research aimed to contribute to the collaborative project *Sal&Mieux*. The purpose of this project is to optimize and reduce discretionary salt use, while making it more effective and maintaining salty taste and food appreciation. My mission was to characterize the salt binding state in carrots, cooked and salted in different ways, by sodium nucleus NMR spectroscopy. Thanks to NMR acquisitions carried out on a large number of samples, the transverse relaxation times of each sample type have been determined. Comparison of relaxation times between samples type give us sodium nucleus binding difference tendencies. The first relaxation time is slightly shorter for a « at the table » salted carrot than a whole carrot salted in water during cooking. This very short time is characteristic of stronger salt bindings with the food matrix. Sodium is therefore more bound when it is added to the plate. The longer relaxation time is also slightly longer for a whole carrot salted in water than for a carrot purée, salted in the same way. Food matrix nature itself, which is very different between those two types of food (purée vs whole carrot) could explain this difference. The main result is that salt could be differently perceived in food depending on the salting process and on the food structure. Sensory analyzes, carried out by project's partners on June 2022, will confirm or disprove our interpretations : sodium bindings' nature influences salt perception. This project's final results will show if our salt consumption can be reduced by optimizing our way to cook and season. However, differences between these relaxation times are weak. To increase the results' reliability, we have to earn more data and undertake more advanced statistical analyses.

Keywords : salt, NMR spectroscopy, sodium nucleus, binding, relaxation time