

La spectroscopie dans le proche infrarouge

Qu'est ce que c'est ?

La spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR) est une technique analytique basée sur le principe d'absorption des rayonnements (infrarouges) par la matière organique. Cette absorption étant liée à la composition chimique des échantillons, on peut estimer cette dernière par la simple mesure de l'absorption de lumière par l'échantillon.

Cette mesure se fait avec un spectromètre soit en « transmission » (on mesure la lumière traversant un échantillon fin), soit en « réflexion » (on mesure la lumière réfléchie par un échantillon épais).

La SPIR nécessite cependant une phase d'étalonnage (ou « calibration ») basée sur des mesures de référence obtenues au laboratoire (composition chimique, valeur alimentaire, etc.) et l'établissement des modèles mathématiques qui permettront de relier le spectre infrarouge au résultat de ces mesures.

La SPIR a un grand nombre d'applications dans le domaine industriel (chimie, pharmacie, agro-industries). Au Cirad-empt elle est utilisée essentiellement pour estimer la composition chimique d'échantillons d'aliments, de fourrages ou de fèces (études de digestibilité).

Cette technique a de nombreux avantages :

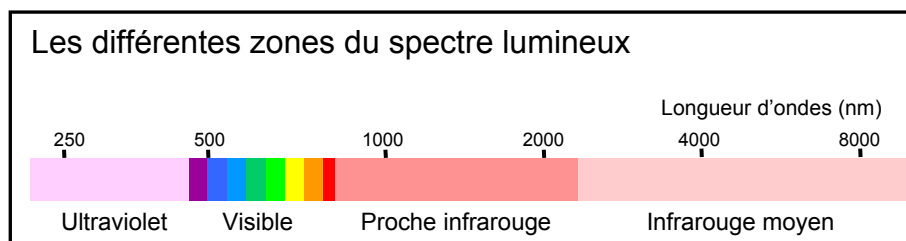
- ◆ **Elle est rapide** : quelques minutes suffisent pour recueillir le spectre d'absorption d'un échantillon, qui servira à la prédiction de sa composition. A comparer avec la très longue durée d'une analyse de composition chimique (plusieurs jours) !
- ◆ **Elle est non destructive** : l'échantillon est récupéré intact après analyse. Cette propriété est particulièrement importante pour des échantillons très peu abondants ou que l'on doit conserver pour des analyses ultérieures
- ◆ **Elle ne nécessite pas une grande quantité d'échantillon** : classiquement 4 à 5 grammes suffisent ! Dans certaines conditions on peut même réaliser des spectres sur des quantités extrêmement faibles : moins d'un gramme d'échantillon voire une graine unique (ce qui est utile dans des études de génétique des plantes). La principale limite à la réduction des quantités est l'obtention d'un échantillon représentatif du produit à analyser (aliment, fourrage, etc.).
- ◆ **Elle est peu onéreuse** : hormis l'investissement initial dans l'appareil et la constitution des « calibrations » pour chaque produit, le coût de passage des échantillons est très faible. Il faut simplement prévoir quelques analyses de référence au laboratoire pour vérifier que la calibration reste correcte au cours du temps et bien adaptée aux nouveaux échantillons. On pratique généralement environ 10% de telles analyses de contrôle.

Cependant il faut savoir :

- ◆ Que la SPIR ne peut généralement pas être utilisée pour estimer les substances minérales, puisqu'elle est basée sur l'absorption du rayonnement par les molécules organiques.
- ◆ Que dans la plupart des cas les substances présentes à l'état de traces dans les échantillons ne peuvent pas être prédites par la technique car le signal leur correspondant est trop faible.

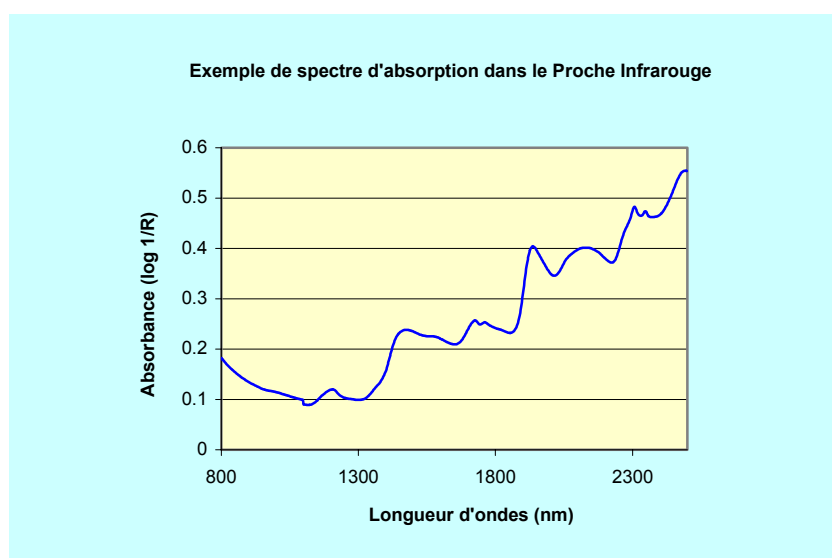
Principe

On appelle « infrarouge » le rayonnement correspondant aux longueurs d'onde directement supérieures à celles du spectre de la lumière visible. Conventionnellement les limites du proche infrarouge se situent entre 800 et 2500 nm.



L'absorption des rayonnements par les échantillons dépend de la composition de la matière organique. En effet les liaisons chimiques sont capables d'absorber les rayonnements correspondant à certaines fréquences particulières. C'est cette propriété des liaisons chimiques de la matière organique que va utiliser la spectroscopie dans le proche infrarouge pour établir un lien entre l'absorption de la lumière et la composition de l'échantillon.

Pour faire cette analyse, l'échantillon va être éclairé à différentes fréquences (ou longueurs d'onde). L'absorption de la lumière à chacune de ces longueurs d'onde constitue le « spectre » de l'échantillon. Ce spectre peut être constitué de plusieurs centaines de longueurs d'onde pour chacune desquelles on a mesuré l'absorption de la lumière.



Le spectre est caractéristique d'un échantillon car il regroupe des informations (quantité et caractéristiques) de chacun de ses constituants organiques (protéines, matières grasses, fibres, etc.).

Cette richesse d'information constitue l'avantage et la difficulté de l'analyse SPIR : beaucoup d'informations sont présentes dans un spectre, mais elles sont complètement emmêlées ! Pour surmonter cette difficulté il faut faire appel à des méthodes statistiques complexes, qui vont permettre de relier les spectres et les analyses chimiques : c'est la phase de « calibration ». Chaque équation de calibration est spécifique d'un paramètre chimique pour une matière première donnée : ce travail doit donc être répété pour chaque nouvelle matière première.

Comment déchiffrer une calibration ?

Une calibration est une régression linéaire entre les caractéristiques des échantillons (teneurs en constituants chimiques, etc.) et l'information « infrarouge » (valeurs de l'absorbance de la lumière à différentes longueurs d'onde). L'interprétation des résultats utilise donc les critères statistiques « classiques » pour évaluer la qualité d'une équation de régression linéaire.

La connaissance des critères principaux de caractérisation des modèles permet de juger rapidement de la qualité des calibrations présentées. L'exemple ci-dessous (calibration de paramètres de composition d'un fourrage) permet de voir le type de tableau synthétique utilisé pour décrire une calibration. Trois groupes d'informations complémentaires sont présentés : la caractérisation de la population sur laquelle le modèle a été établi, la qualité de la régression, et sa validation, c'est-à-dire l'évaluation de la précision que l'on aura lors de l'utilisation pratique de la calibration.

Paramètre à étalonner	Population			Régression			Validation		
	N	Moyenne	Ecart type	Termes	SEC	R ²	SECV	SEP	RPD
MO	236	93.0	1.54	11	0.25	0.97	0.34	0.40	4.5
MAT	226	12.0	4.92	9	0.32	1.00	0.41	0.43	12.0
NDF	237	62.8	7.83	8	1.12	0.98	1.29	1.45	6.1
ADF	236	33.5	5.60	9	0.61	0.99	0.77	0.85	7.3
ADL	237	5.5	1.84	8	0.34	0.97	0.42	0.80	4.3

Caractérisation de la population d'établissement du modèle

Nombre, moyenne et écart-type des échantillons utilisés pour l'établissement de la calibration. On considère généralement qu'une calibration doit s'appuyer sur un minimum de 60-100 échantillons selon la nature des matériaux. Cependant un nombre restreint d'échantillons (30-50) peut permettre une « étude de faisabilité » de la prédiction SPIR pour un produit. Pour obtenir des calibrations plus robustes, il est préférable d'avoir une population assez variable.

Caractéristiques statistiques du modèle de calibration

SEC (écart-type résiduel de la calibration) et R² (Coefficient de détermination) sont des indices de la précision des calibrations et de l'ajustement des données.

Un « bon » modèle de calibration a un SEC se rapprochant de la répétabilité de l'analyse de référence.

Termes = Nombre de variables de l'équation de calibration.

Critères de validation du modèle

Le SECV¹ et le SEP² sont des indications de la précision avec laquelle le modèle de calibration pourra prédire de nouveaux échantillons. La différence est que le SECV mesure cette capacité sur des échantillons de la population d'établissement de la calibration tandis que SEP la mesure sur des échantillons totalement nouveaux. Ces deux paramètres doivent bien entendu avoir les valeurs les plus proches possible de la répétabilité de l'analyse de référence.

Le RPD³ est le rapport entre la variabilité de la population (écart-type) et la précision de la calibration (SECV ou SEP). Ce rapport est donc une indication de l'information apportée par le modèle. On considère souvent qu'un modèle est intéressant à partir de RPD=3-4 et très bon au-delà de 6 ... mais ce jugement doit tenir compte de la variabilité de la population de base et de la précision de la mesure de référence.

¹. Ecart type résiduel de la « validation croisée »

². Ecart type résiduel de la prédiction

³. Ratio performance / déviation

Exemples d'applications

La valeur alimentaire des fourrages tropicaux

Se basant sur les milliers d'échantillons des collections du Cirad-emvt, il a été possible d'établir des calibrations pour les paramètres analytiques et la valeur alimentaire de nombreux fourrages tropicaux. Ainsi la mise au point de calibrations nouvelles peut s'appuyer sur une information déjà abondante.

La taille de la base de données permet aussi l'utilisation de « calibrations locales » : pour un échantillon donné, il est possible de sélectionner des échantillons spectralement similaires dans la base afin d'établir une prédiction réellement adaptée.

Les études de digestibilité

En alimentation animale, la digestibilité des fourrages et aliments est une information extrêmement importante. La SPIR permet dans certains cas une estimation de certains paramètres de digestibilité à partir des fecès des animaux¹. Certaines études concernent l'alimentation des ruminants domestiques ou sauvages sur parcours. L'allègement du travail analytique apporté par la SPIR permet des protocoles d'étude plus complets, avec notamment un suivi de nombreux animaux dans l'espace et au cours du temps, alors que les méthodes d'analyse classiques n'auraient pas permis l'analyse des centaines (parfois milliers) d'échantillons impliqués dans ces études. Dans un autre domaine, la SPIR a permis, en collaboration avec l'INRA, de mesurer la digestibilité des aliments sur des centaines de volailles et de mettre en évidence la variabilité individuelle et l'héritabilité de ce paramètre².

La variabilité de la qualité des sous produits de récolte

Des études de composition et de valeur alimentaire de sous produits de récolte (sorghos) ont été entreprises afin d'identifier la variabilité génétique de ces paramètres. En effet, à production de grains équivalente, la quantité et la qualité des tiges et des feuilles de sorgho peuvent varier considérablement – d'où l'intérêt de prendre en compte ces facteurs dans la sélection des variétés. Mais ces études nécessitent un nombre très important de mesures, et l'utilisation de la SPIR permet donc une amplification des protocoles mis en place³.

¹ Lecomte P, Fall S, Friot D, Richard D, Ickowicz A, Guerin H et Bonnal L. 2003. Calibration de critères de valeur alimentaire *in vivo* sur les données spectrales proche Infrarouge des feces émises par l'animal. Cas de rations distribuées à des ruminants tropicaux (Sénégal). Présenté aux 10èmes Recherches Rencontres Ruminants.

² Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Péron A., Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis JM, Carré B. Heritability of digestibilities and divergent selection for digestion ability in growing chicks fed on a wheat diet. Soumis à Poultry science

³ Kondombo C.P. 2001. Evaluation agronomique et fourragère de 194 lignées recombinantes de sorgho. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur du développement rural. Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.

Le laboratoire d'alimentation animale du Cirad-emvt

- ◆ propose des calibrations pour de nombreux produits : principaux fourrages tropicaux, matières premières, aliments ...
- ◆ développe des calibrations dans le cadre de projets de recherche en partenariat avec divers organismes. Le lien étroit de l'activité SPIR avec le laboratoire d'analyse permet l'adaptation des calibrations existantes à de nouvelles séries d'échantillons.
- ◆ fournit un appui méthodologique pour l'intégration de la technique dans des protocoles de recherche ou des projets de développement, dans le but d'alléger le travail analytique et/ou de permettre des mesures sur un grand nombre d'échantillons.
- ◆ peut conseiller et aider ses partenaires pour le transfert de la technologie, le travail en réseau et le développement des compétences.
- ◆ propose des formations à la technique SPIR .

Laboratoire d'alimentation animale Cirad-emvt

TA 30/A Campus international de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 05, France
Tél. +33 (0)4 67 59 38 74 – Fax : +33 (0)4 67 59 38 25
Courriel : spirnut@cirad.fr