

La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale

La spectroscopie proche infrarouge est une technique d'analyse qui permet de connaître la composition chimique des aliments et matières premières beaucoup plus rapidement que les dosages biochimiques classiques. Les développements actuels de cette technique s'orientent vers une prédiction directe de la valeur nutritionnelle des aliments.

Dans les industries de l'alimentation animale, une grande partie du contrôle de qualité des matières premières et des produits finis repose sur des analyses biochimiques. Les aliments doivent respecter des spécifications particulières en ce qui concerne les concentrations des constituants principaux (eau, protéines, glucides, lipides...). Les méthodes de référence sont généralement longues à mettre en oeuvre, nécessitent l'emploi de réactifs coûteux et polluants et ne peuvent être appliquées que par des opérateurs qualifiés. Par exemple, l'analyse des protéines brutes par la méthode de Kjeldahl est basée sur la minéralisation de l'azote organique en utilisant de l'acide sulfurique chaud et des catalyseurs toxiques. L'analyse au laboratoire demande environ 3 heures. En utilisant la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) la même mesure

peut être réalisée en moins d'une minute, sans manipulation de réactifs toxiques. De plus, si le spectromètre proche infrarouge (PIR) est correctement étalonné, beaucoup d'autres analyses du même échantillon peuvent être réalisées sans coût additionnel. Les techniques analytiques rapides présentent un grand intérêt pour le contrôle de fabrication. Les résultats analytiques portant sur les matières premières et les produits en cours de transformation peuvent être exploités par le responsable de production afin de vérifier que la transformation s'effectue normalement. Avec une méthode analytique traditionnelle, il serait impossible d'ajuster rapidement les paramètres de la production en cours. Un autre intérêt de la technique PIR est qu'elle permet l'évaluation rapide de la valeur nutritionnelle des matières premières. De telles évaluations par des méthodes de référence (qui impliquent des essais nutritionnels sur animaux) sont extrêmement onéreuses et demandent plusieurs semaines pour une seule mesure. Dans ce domaine, la technique PIR s'est avérée particulièrement efficace pour prévoir la digestibilité des fourrages et d'autres aliments des ruminants.

Résumé

La spectroscopie proche infrarouge est très couramment utilisée dans un grand nombre d'industries et donne lieu à des applications analytiques très diverses. L'article présente, de manière synthétique, le principe de cette méthode analytique et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. Les fondements théoriques de la spectroscopie vibrationnelle sont tout d'abord présentés simplement. Les principes de fonctionnement des spectromètres adaptés aux applications analytiques sont ensuite décrits. Les aspects statistiques de l'établissement d'un étalonnage sont également succinctement exposés. La dernière partie est consacrée aux applications analytiques : dosage des constituants majeurs des aliments, valeur de critères nutritionnels (digestibilité, énergie métabolisable) chez le monogastrique et le ruminant.

La première application analytique de la SPIR a été développée en 1962 par Karl Norris qui travaillait comme ingénieur au ministère de l'agriculture des USA (Hart, Norris et Golumbic 1962). Dans cette première étude, les auteurs décrivent une méthode permettant

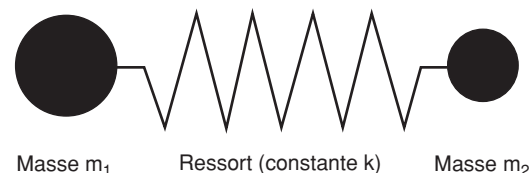
de mesurer la teneur en eau d'échantillons de céréale. Dans ces essais, l'eau est tout d'abord extraite des grains par dissolution dans le méthanol et les mesures spectrales sont effectuées en transmission sur l'extrait méthanolique. En 1968, Ben-Gera et Norris ont montré qu'il était possible d'obtenir des spectres en réflexion diffuse qui soient exploitables sans mettre en jeu un solvant comme le méthanol. Ils ont également eu l'idée révolutionnaire d'utiliser la régression linéaire multiple pour établir les équations prédictives liant les valeurs spectrales aux analyses de laboratoire. En 1972, sous la conduite de P. Williams, le laboratoire de la *Canadian Grain Commission* a adopté la technique PIR comme méthode d'analyse de routine de la protéine dans le blé (Williams 1992), en remplacement du dosage de Kjeldahl. Pendant la période 1972-1973, cette décision a eu comme conséquence d'éviter l'utilisation de 47 tonnes de réactif chimique fortement agressif ! En 1976, J.S. Shenk et son équipe sont parvenus à estimer par SPIR la qualité et la digestibilité de fourrages destinés à l'alimentation des ruminants (Norris, Barnes, Moore et Shenk 1976). La SPIR est alors apparue comme méthode utilisable dans les industries alimentaires, pétrochimiques et pharmaceutiques. J.S. Shenk a également développé le concept de réseau de spectromètres. Dans de tels réseaux, les appareils sont interconnectés et sont étalonnés de manière à donner exactement la même réponse spectrale. Il devient alors facile de vérifier le bon fonctionnement des appareils et de transférer des équations d'étalonnage d'un spectromètre à un autre. A partir de cette période, les constructeurs ont mis sur le marché de nombreux types de spectromètres (à filtres, à monochromateur, à transformée de Fourier...) consacrés aux applications analytiques les plus diverses. Plus récemment, les progrès de la chimométrie donnent des outils efficaces pour extraire l'information utile présente dans les données spectrales.

Dans le présent article, seuls les aspects fondamentaux de la SPIR et quelques applications sont présentés. Les lecteurs intéressés pourront trouver une information plus détaillée dans les ouvrages spécifiques (Burns et Ciurczak 1992, Osborne *et al* 1993, Bertrand et Dufour 2000).

1 / Théorie

La spectroscopie peut être définie comme l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. La région du proche infrarouge couvre la plage des longueurs d'onde de la lumière comprise entre 800 et 2500 nanomètres (nm, soit 10^{-9} m). Cette région est une partie du domaine de la spectroscopie vibrationnelle, qui inclut également la région de l'infrarouge moyen (2500-25000 nm). On peut modéliser simplement une molécule comme étant un ensemble d'atomes reliés entre eux par des ressorts (figure 1). Ces liaisons sont le résultat d'un équilibre des forces. On observe, d'une part, une répulsion entre les noyaux chargés positivement et entre les nuages d'électrons chargés négativement. Il y a, d'autre part, une attraction entre le noyau d'un

Figure 1. Modèle simple d'une molécule diatomique : les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k .



atome et les électrons de l'autre, et vice-versa (Banwell 1983). Chaque ressort vibre à une fréquence donnée qui dépend du groupe chimique impliqué dans la liaison. L'énergie d'un rayon lumineux incident ne peut être absorbée que lorsque la fréquence de la lumière est identique à la fréquence propre de la liaison intermoléculaire. Il faut noter que, étant donné que la vitesse de la lumière (c) est une constante universelle, la longueur d'onde λ et l'inverse de la fréquence ν sont proportionnelles : $\lambda = c/\nu$. Un spectre est obtenu en enregistrant l'intensité de la lumière absorbée en fonction de la fréquence (ou de la longueur d'onde) de la lumière incidente. La manière la plus simple de présenter la spectroscopie proche infrarouge est de commencer par le modèle le plus élémentaire qui consiste en une molécule diatomique en vibration.

1.1 / La molécule diatomique

a / L'oscillateur harmonique

Dans ce modèle très simple, nous considérons deux masses m_1 et m_2 reliées par un ressort dont la constante de force est égale à k (figure 1). Nous supposons de plus que la liaison suit la loi de Hooke, donnée par :

$$f = -k(r - r_{eq})$$

avec f la force qui s'exerce sur la particule, r sa position et r_{eq} la position d'équilibre.

Dans ces conditions, la courbe de l'énergie est parabolique et symétrique autour de la position d'équilibre r_{eq} . L'énergie est donnée par :

$$E = k(r - r_{eq})^2 / 2$$

La fréquence propre de la vibration de la liaison est donnée par l'équation :

$$n = (k / \mu)^{1/2} / 2\pi$$

avec μ la masse réduite, $\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$

Cette équation très simple peut être employée pour calculer la position approximative d'une bande fondamentale (dans la région de l'infrarouge moyen) lorsqu'on connaît la constante de force k et les masses des deux atomes (Pavia *et al* 1996). L'accord entre la position calculée et celle qui est observée expérimentalement n'est pas très satisfaisant. Dans ce modèle, une liaison ne possède qu'une seule fréquence propre. En réalité, les liaisons inter atomiques ont plusieurs fréquences de vibration (fondamentales, harmoniques et bandes de combinaison). On peut tenir compte de cette constatation grâce au modèle anharmonique

b / Oscillateur anharmonique

Les liaisons atomiques ne suivent pas exactement les lois décrites par le modèle harmo-

nique. Par exemple, si la liaison est très fortement comprimée, l'énergie augmente plus que ce que prévoit la loi de Hooke. Au contraire, si la liaison est étirée, la force de liaison tend à diminuer jusqu'à un point auquel la molécule se dissocie en libérant ses atomes constitutifs.

L'énergie du modèle anharmonique est donnée par la fonction de Morse :

$$E = D_e [1 - \exp(a(r_{eq} - r))]^2$$

avec D_e l'énergie de dissociation et a une constante caractéristique de la liaison entre les atomes.

Une conséquence très importante de l'anharmonicité est qu'une liaison donnée vibre généralement à plusieurs fréquences correspondant à la fondamentale et aux harmoniques.

Plus précisément, les fréquences sont données par :

$$\text{- fondamentale : } \nu_1 = \nu_0 (1 - 2 x_e)$$

$$\text{- première harmonique : } \nu_2 = 2\nu_0 (1 - 3 x_e)$$

$$\text{- deuxième harmonique : } \nu_3 = 3\nu_0 (1 - 4 x_e)$$

avec ν_0 une fréquence de référence qui dépend de la nature de la liaison, et x_e la constante d'anharmonicité. Comme x_e prend de petites valeurs, la fréquence fondamentale, les premières et deuxièmes harmoniques apparaissent respectivement à des fréquences voisines de ν_0 , $2 \nu_0$ et $3 \nu_0$. A partir de la relation $\lambda = c/\nu$ on peut voir que les longueurs d'onde correspondantes se situent respectivement à λ_0 , $\lambda_0/2$, $\lambda_0/3$.

1.2 / Molécules polyatomiques

D'après la théorie, une molécule contenant N atomes a $3N-6$ degrés de liberté de vibration ($3N-5$ pour les molécules linéaires). Cependant, toutes les liaisons inter-atomiques ne sont pas capables d'absorber de l'énergie

lumineuse infrarouge, même dans le cas où la fréquence de la lumière est la même que la fréquence propre de la liaison. Seules les liaisons qui présentent un moment électrique dipolaire oscillant sont "actives dans l'infrarouge". La figure 2 donne des exemples de quelques modes vibratoires typiques. A chaque mode correspondent une fréquence propre fondamentale et plusieurs autres fréquences associées aux harmoniques. De plus, on observe souvent des interactions entre les

Figure 2. Exemple de vibrations atomiques : la chaîne hydrocarbonée.

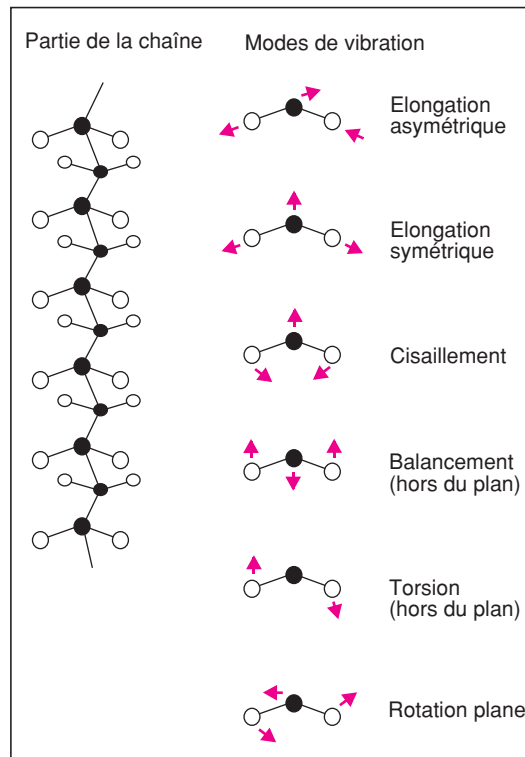
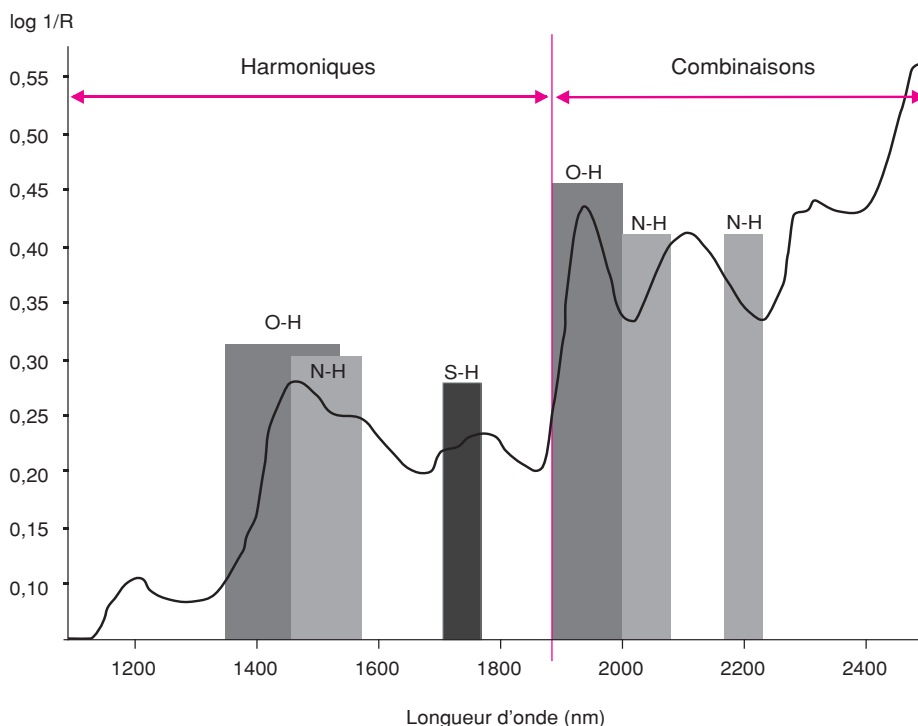


Figure 3. Bandes d'absorption dans le proche infrarouge. NB : Les liaisons C-H sont à l'origine de bandes d'absorption dans toute cette région spectrale.



modes d'une liaison particulière et ceux d'autres liaisons. Ces interactions se traduisent par l'apparition de bandes de combinaison. De telles bandes apparaissent à des fréquences qui sont elles-mêmes des combinaisons linéaires des fréquences des bandes fondamentales. Par exemple, si les fréquences de deux modes formant une combinaison sont représentées par ν_1 et ν_2 , la fréquence de la bande de combinaison est donnée par :

$$\nu_{\text{comb}} = \alpha\nu_1 + \beta\nu_2$$

où α et β sont des nombres entiers (généralement 1, 2 ou 3).

Ainsi, comme pour les harmoniques, les bandes de combinaison apparaissent à des fréquences plus élevées (c'est-à-dire à des longueurs d'onde inférieures) que les bandes fondamentales.

La région spectrale du PIR est le domaine des bandes harmoniques et des bandes de combinaison (figure 3). Les groupements chimiques présentant une absorption dans la région du PIR sont principalement de la forme X-H, où X correspond aux atomes de carbone, d'oxygène ou d'azote, et H désigne l'atome d'hydrogène. D'une manière générale, il est plus difficile d'interpréter les spectres PIR que leur équivalent dans la région de l'infrarouge moyen. Cependant, la région du PIR est bien adaptée au développement des applications analytiques, pour deux raisons principales. Tout d'abord, les harmoniques et les bandes de combinaison sont moins intenses que les fondamentales correspondantes : la lumière est moins fortement absorbée dans le PIR que dans l'infrarouge moyen. La lumière incidente pénètre de plusieurs millimètres à

l'intérieur du produit étudié, et il n'est pas nécessaire de le diluer pour obtenir des spectres exploitables. De plus, les bandes d'absorption PIR forment des pics larges (figure 3) : une petite dérive dans l'échelle des longueurs d'onde ne changerait pas considérablement l'intensité de la lumière absorbée. C'est un avantage pour les applications analytiques qui sont basées sur la mesure de la lumière absorbée à des longueurs d'onde données.

2 / Principe de fonctionnement et appareillage

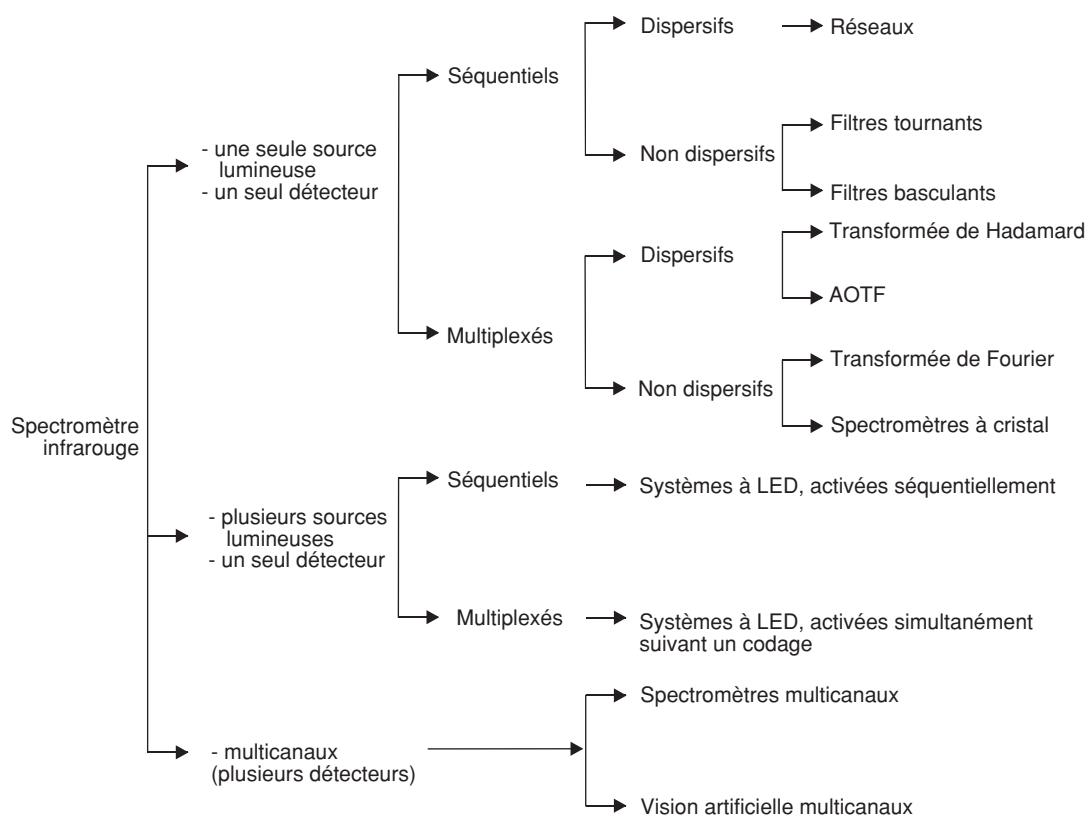
Les spectres sont acquis à l'aide de spectromètres qui incluent au moins 4 parties essentielles :

- une source lumineuse ;
- un système de séparation de lumière polychromatique en fonction des longueurs d'onde ;
- un système permettant de présenter l'échantillon ;
- un ou plusieurs capteurs photosensibles.

Beaucoup d'instruments commerciaux sont spécifiquement consacrés aux applications analytiques industrielles dans la région du PIR. Leurs principes peuvent être très différents d'un instrument à un autre, mais on peut distinguer trois grandes familles (figure 4).

Dans les appareils séquentiels, les absorptions lumineuses sont mesurées les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel. Les instruments typiques de ce groupe sont les spectromètres à filtres optiques ou à monochromateur.

Figure 4. Classification des spectromètres proche infrarouge selon leur principe de fonctionnement. AOTF : acoustico-optico-tunable filter (filtres acoustico-optiques modulables), LED : light emitting diodes (diodes émettrices de lumière).



Dans les spectromètres multiplexés, le capteur photosensible reçoit simultanément l'information correspondant à plusieurs longueurs d'onde. Les signaux sont donc acquis à l'aide d'un capteur unique. Un système de codage permet d'obtenir les spectres à partir des signaux ainsi obtenus. Les instruments à transformée de Fourier sont des exemples de systèmes multiplexés.

Enfin, les spectromètres multicanaux ont plusieurs capteurs photosensibles qui peuvent enregistrer indépendamment l'absorption de la lumière à des longueurs d'onde spécifiques. Les systèmes à barrette de diodes et les caméras appartiennent à ce groupe.

Nous présentons ici le principe de fonctionnement de quelques spectromètres qui représentent la majorité des instruments actuellement commercialisés.

2.1 / Appareils à filtres et à monochromateur

Dans les appareils à filtres (figure 5), les longueurs d'onde de la source lumineuse sont sélectionnées par une série de filtres optiques interférentiels placés sur un barillet tournant. Grâce à ce dispositif, les filtres sont placés les uns après les autres dans le trajet optique de la lumière. La source lumineuse est une lampe à halogène-tungstène, et le détecteur est généralement un semi-conducteur au sulfure de plomb (PbS). Ces systèmes, consacrés à l'analyse de routine simple, peuvent inclure de 3 à 20 filtres. Ils sont robustes, et ont un bon rapport signal/bruit. De nombreuses applications analytiques courantes ont été développées en utilisant ce système, et les fabricants d'appareils sont généralement en mesure de proposer les ensembles de filtres les mieux adaptés à une analyse particulière. La figure 6 montre un exemple d'appareil à filtres conçu pour le contrôle « en ligne » (Benson 1990). La matière première est convoyée par un tapis mobile. La lumière de la lampe quartz-halogène forme un faisceau parallèle qui éclaire le produit. La vitesse de rotation du barillet à filtres est d'environ 50

Hertz, ce qui permet d'obtenir une mesure pratiquement continue. Une proportion de la lumière proche infrarouge réfléchie par le produit est collectée par un miroir courbe et focalisée sur un détecteur au sulfure de plomb. Ce dispositif est bien adapté aux produits présentant une granulométrie fine et dont la taille des particules est régulière. Il a été mis en oeuvre dans de nombreuses applications telles que la mesure de l'humidité dans divers produits et l'analyse des protéines dans le tourteau de soja.

Le principe des spectromètres à monochromateur (figure 7) est très voisin de celui des appareils à filtres. La lumière à différentes longueurs d'onde est ici sélectionnée par un monochromateur à réseau holographique. La rotation du monochromateur est commandée par un moteur pas à pas qui peut donner un très grand nombre de positions angulaires correspondant aux longueurs d'onde sélectionnées.

Figure 5. Principe d'un spectromètre à filtres optiques.

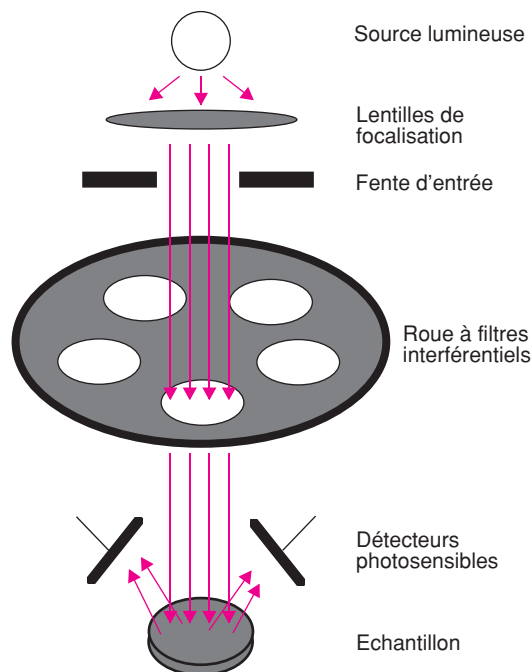


Figure 6. Exemple d'un spectromètre à filtres conçu pour l'analyse « en ligne ».

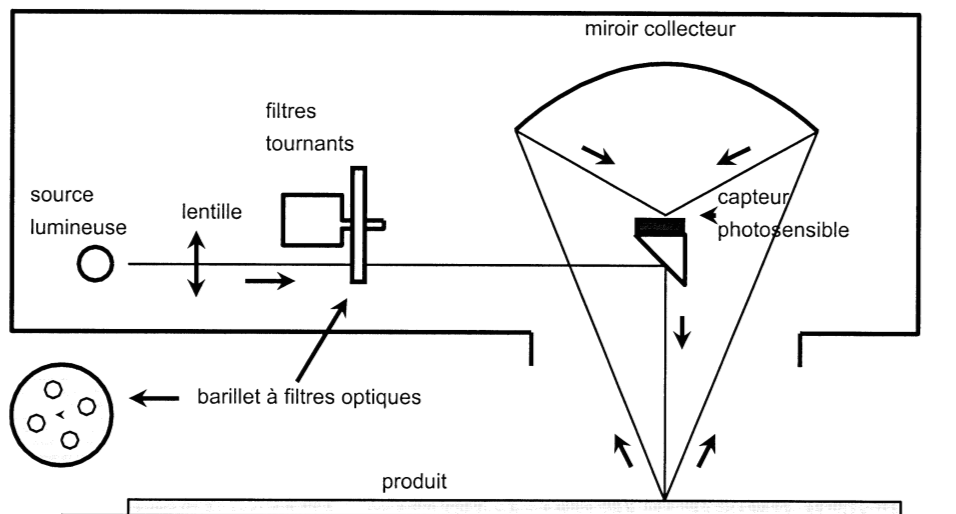


Figure 7. Principe d'un spectromètre à monochromateur.

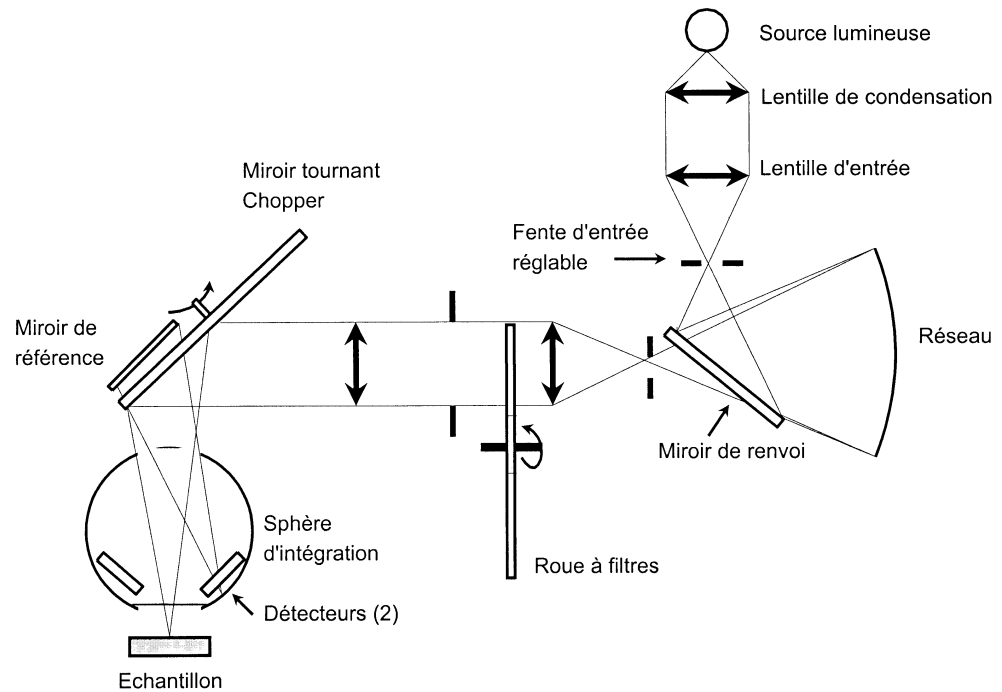
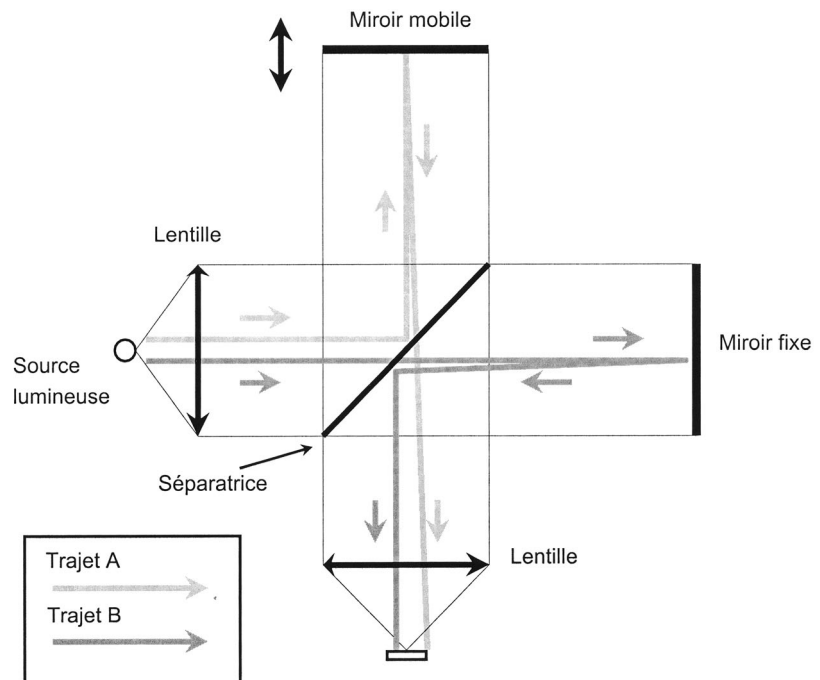


Figure 8. Principe d'un interféromètre de Michelson (spectromètre à transformée de Fourier).



tionnées. Un tel système peut typiquement enregistrer l'absorption de la lumière de 1100 nm à 2458 nm avec un intervalle de 2 nm, donnant ainsi 700 points de mesure pour chaque spectre acquis. Quelques instruments peuvent également balayer la région du visible et du « très proche infrarouge » (400-1100 nm). Ces appareils ne sont pas trop sensibles aux vibrations et peuvent être installés dans un environnement industriel.

2.2 / Transformée de Fourier et appareils multiplexés

Initialement conçus pour le travail de recherche et la plage spectrale de l'infrarouge moyen, les spectromètres à transformée de

Fourier peuvent de nos jours concurrencer les appareils séquentiels même dans le domaine des applications industrielles. Le dispositif principal de ces appareils est l'interféromètre de Michelson (figure 8). Dans ce système, le rayon lumineux peut prendre deux trajets optiques différents, ce qui crée une interférence. La lumière est d'abord dirigée vers une séparatrice, qui est conçue de telle manière que la moitié de la lumière soit réfléchi (trajet A), et l'autre moitié transmise (trajet B). Le rayon correspondant au trajet B atteint alors un miroir fixe, il est renvoyé sur la séparatrice et parvient finalement au détecteur. Le rayon associé au trajet A atteint le miroir mobile puis est transmis au détecteur à travers la séparatrice. On peut voir que le dépla-

cement du miroir mobile permet de changer la longueur du trajet optique A. Quand le miroir mobile est dans une position telle que le trajet A et le trajet B soient de longueurs égales, l'interférence est constructive. Pour un rayon monochromatique de longueur d'onde λ , l'interférence est également constructive quand la différence des deux trajets, désignée par δ , est un multiple entier de λ tel que $2\lambda, 3\lambda \dots$. Au contraire, les rayons interfèrent de manière destructive lorsque $\delta = \lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2 \dots$. L'échantillon est placé dans le trajet des rayons lumineux, à proximité du détecteur. Si le miroir mobile se déplace à une vitesse constante, un rayon lumineux monochromatique est à l'origine, par l'intermédiaire du détecteur, d'un signal électrique sinusoïdal. De la même manière, pour une lumière polychromatique, le signal enregistré, appelé interférogramme, est la somme de fonctions sinusoïdales. Pour $\delta = 0$, toutes les longueurs d'onde interfèrent positivement, et l'interférogramme prend sa valeur la plus élevée. Au contraire, quand la différence de trajet optique δ est grande, la valeur de l'interférogramme est proche de 0. Ainsi, l'interférogramme est la somme de fonctions sinusoïdales et sa transformée de Fourier donne des intensités en fonction des fréquences, ce qui est la présentation habituelle des spectres.

L'avantage principal des spectromètres à transformée de Fourier est que les longueurs d'onde sont repérées avec précision, sans aucun décalage.

Certains nouveaux appareils multiplexés repose sur l'utilisation d'un cristal (Kradjel *et al* 1992). De la même manière que dans les spectromètres à transformée de Fourier, les interférences sont ici obtenues à partir de rayons lumineux qui suivent deux trajets optiques de longueurs différentes. Dans un spectromètre à polarisation par cristal, la lumière traverse un cristal biréfringent qui la divise en deux rayons appelés «ordinaire» et «extraordinaire». Les indices de réfraction correspondant à ces deux rayons sont légèrement différents. Dans ces conditions, les rayons ordinaire et extraordinaire sont à l'origine d'interférences. Lorsqu'on change l'épaisseur du cristal, on change également la différence des deux trajets optiques.

2.3 / Appareils à barrette de diodes

Dans des instruments à barrette de diodes, l'échantillon est illuminé par un rayon polychromatique. La lumière transmise ou réfléchie est alors dispersée au moyen d'un monochromateur. Une rangée de diodes photosensibles est placée dans le plan de dispersion de ce monochromateur. Chaque diode enregistre donc l'intensité de la lumière correspondant à une longueur d'onde donnée. La barrette inclut typiquement plusieurs centaines de diodes photosensibles. Les diodes les plus courantes sont des semi-conducteurs indium-gallium-arsénide (InGaAs), sensibles entre 900 et 1700 nm. Ces détecteurs à semi-conducteurs présentent une sensibilité satisfaisante jusqu'à 2200 ou à 2400 nm. Les barrettes de diode sont souvent équipées de dispositif de

refroidissement à effet Peltier, ce qui permet d'améliorer le rapport signal/bruit. Les spectromètres commerciaux à barrette de diodes couvrent la plage de longueurs d'onde entre 400 et 1700 nm, avec une résolution spectrale de ± 5 nm, ce qui est suffisant pour la plupart des applications analytiques. Comme ces spectromètres n'ont aucune pièce mobile, ils sont robustes et bien adaptés au contrôle «en ligne», même dans un environnement agressif. Dardenne et Féménias (1999) ont utilisé un instrument de ce type pour analyser la teneur en matière sèche du fourrage à l'état frais lors de la récolte. Le spectromètre était embarqué sur la récolteuse et placé au-dessus du tapis mobile qui déverse le fourrage sur le sol après pesée. Dans ces conditions, l'erreur type de vérification croisée (SECV, *standard error of cross validation*) obtenue pour le dosage de la matière sèche était d'environ 1%. Cette précision est en pratique suffisante pour l'application envisagée.

3 / Chimométrie

Selon Geladi (1995), la chimométrie (en anglais *chemometrics*) est la « science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques dans le but d'améliorer l'extraction des informations obtenues à partir des données analytiques ». Les spectres PIR contiennent des informations pertinentes sur les caractéristiques physiques et biochimiques des échantillons mesurés. Cependant, ces informations sont "cachées" dans les spectres, et nécessitent un certain effort pour être correctement extraites. La plupart des applications du PIR portent sur l'analyse de la composition du produit considéré. Cependant, d'autres applications mettant en oeuvre une caractérisation qualitative (telle que l'authentification des produits) ont été mises au point. On peut classer les méthodes chimométriques en fonction de leur nature linéaire ou non linéaire. Les méthodes linéaires font l'hypothèse que l'information utile peut être extraite à partir de combinaisons linéaires des variables prédictives. Les méthodes non linéaires ne reposent pas sur cette hypothèse. Elles appartiennent au domaine de l'intelligence artificielle et mettent principalement en jeu les réseaux de neurones. Fondamentalement, un réseau de neurones est un ensemble de cellules reliées les unes avec les autres, appelées neurones par analogie avec le système nerveux. Les réseaux de neurones ne seront pas présentés ici. Le lecteur intéressé trouvera une bonne introduction à l'intelligence artificielle dans le livre de Beale et Jackson (1990). Un deuxième élément de classement de ces méthodes porte sur leur nature non supervisée (ou descriptive) ou supervisée (prédictive). Dans l'approche non supervisée, on ne dispose que des données spectrales, sans autre information complémentaire sur la nature des données. C'est le cas, par exemple, de l'analyse en composantes principales (ACP) ou des réseaux de Kohonen. Ces méthodes sont souvent très puissantes mais sont rarement mises en oeuvre dans l'industrie. Dans les méthodes supervisées, les données spectrales PIR sont exploitées dans le

but de prédire une variable qualitative ou quantitative. La grande majorité des applications de la SPIR reposent sur des méthodes supervisées et linéaires pour la prévision de variables quantitatives. Les méthodes chimiométriques les plus couramment utilisées sont la régression linéaire pas à pas et la méthode PLS (*Partial Least Squares* ou moindres carrés partiels) mais beaucoup d'autres méthodes de régression ont été proposées. Le but de ces méthodes est d'établir un modèle linéaire liant une variable à prédire y avec les données spectrales recueillies dans une matrice X .

Le modèle de régression est donné par :

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum x_i \beta_i$$

où \hat{y} est la valeur à prédire, x_i l'absorbance à la longueur d'onde i et β_i sont les coefficients du modèle (à estimer).

Dans la régression linéaire multiple pas à pas, un sous-ensemble de variables prédictives est introduit dans le modèle, tandis que dans la régression PLS, toutes les absorbances disponibles sont prises en considération.

Les facteurs de variations incontrôlés des données spectrales sont nombreux et le développement d'une nouvelle application analytique est en général une tâche assez longue, qui comprend plusieurs étapes. Il est tout d'abord nécessaire de collecter une série d'échantillons représentatifs assez importante, comportant typiquement entre 50 et plusieurs centaines de produits de même nature. Tous ces échantillons sont analysés par la méthode de laboratoire de référence, ce qui représente la partie plus longue et la plus onéreuse de la mise au point d'une analyse. La collection est alors aléatoirement divisée en un ensemble d'échantillons d'étalonnage (en anglais : *calibration*) et une autre série qui sera utilisée pour la validation du modèle.

On utilise la collection d'étalonnage pour estimer les coefficients de régression β_i du modèle. Les systèmes d'analyse par SPIR sont généralement équipés des logiciels nécessaires à l'établissement de ce modèle. Dans les méthodes de régression, la qualité de l'ajustement du modèle est généralement évaluée à partir de l'erreur type d'étalonnage (en anglais : *Standard error of calibration, SEC*) donnée par :

$$SEC = \sqrt{\frac{1}{n-k-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

où n est le nombre d'échantillons d'étalonnage, k le nombre de variables prédictives incluses dans le modèle, y_i la valeur de référence observée (à prédire), et \hat{y}_i la valeur prédite, pour l'échantillon i .

Une fois que le modèle a été établi, il peut être appliqué sur des échantillons inconnus.

L'exactitude de la régression peut être évaluée, sur des échantillons n'ayant pas participé à l'étalonnage, par la racine carrée de l'erreur quadratique (en anglais : *root mean square error of prediction ou RMSEP*) :

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

avec m : le nombre d'échantillons de vérification.

Si le modèle a été correctement établi, les deux valeurs RMSEP et SEC doivent être voisines. Si le modèle apparaît comme satisfaisant, il peut être appliqué dans l'analyse de routine, afin d'analyser des échantillons inconnus. Une bonne pratique consiste à vérifier régulièrement l'exactitude de l'analyse en présentant, dans la chaîne analytique, des échantillons qui ont été analysés par la méthode de référence.

4 / Applications

4.1 / Constituants majeurs

Une grande partie des applications industrielles de la SPIR porte sur l'analyse des constituants majeurs tels que l'eau, les protéines, les lipides ou les sucres.

a / Eau

La mesure de l'humidité est probablement l'application principale de la SPIR. L'eau pure présente de fortes bandes d'absorption à 970, 1190, 1440 et 1940 nm. La bande la plus intense se situe à 1940 nm. C'est une bande de combinaison des vibrations de cisaillement et d'élongation. Les bandes à 970 et à 760 nm sont respectivement les deuxième et troisième harmoniques des vibrations d'élongation. La position et la forme des bandes d'absorption de l'eau sont affectées par de nombreux facteurs tels que la température, la concentration des solutés et la granulométrie de l'échantillon. De plus, l'état de l'eau et la nature des liaisons hydrogène ont une importance marquée sur la forme du spectre dans la région spectrale de 1400-1500 nm. Dans la farine de blé, la teneur en eau est proportionnelle à la différence entre l'absorbance à 940 et à 2310 nm (Osborne *et al* 1993). Il est cependant généralement indispensable d'appliquer des équations d'étalonnage plus sophistiquées pour prédire la teneur en eau des aliments.

La mesure de l'humidité par SPIR peut être aussi précise que la méthode de référence (séchage à l'étuve). L'erreur (RMSEP) est de l'ordre de 0,17 % pour les produits les plus homogènes tels que des farines, mais peut varier en fonction de l'hétérogénéité des produits étudiés. Les résultats sont plus précis pour une matière première que pour des mélanges complexes. Les erreurs de mesure d'humidité peuvent varier de 0,15 à 0,8 % en fonction de l'aliment analysé.

b / Protéines

Le spectre PIR des protéines est complexe et difficile à interpréter. Les protéines présentent des bandes d'absorption caractéristiques à 1523, 1600 nm, 2050 nm et 2180 nm. La

bande à 2180 nm est souvent exploitée dans l'analyse des protéines. Osborne *et al* (1993) ont donné un exemple d'équation de prévision des protéines dans la farine de blé :

$$\% \text{protéines} = 12,68 + 493,7 * A_{2180} - 323,1 * A_{2100} - 243,4 * A_{1680}$$

A_{2180} signifiant absorbance à 2180 nm.

Le facteur $323,1 * A_{2100}$ est nécessaire pour tenir compte du spectre de l'amidon, qui peut recouvrir la bande d'absorption des protéines à 2180 nm. L'absorption à 1680 nm sert de point de référence de la ligne de base du spectre. L'analyse des protéines dans des produits simples tels que la farine est très précise. L'erreur d'analyse est plus importante pour les produits très hétérogènes et les mélanges constituants les aliments composés. Elle s'étend de 0,16 à 0,45 % et est tout à fait comparable à l'erreur de la mesure de référence (dosage de Kjeldahl).

c / Lipides

Les lipides donnent des spectres simples qui sont principalement représentatifs de la longue chaîne hydrocarbonée des acides gras. Les bandes d'absorption principales apparaissent à 1734, 1765, 2304 et à 2348 nm. Les lipides sont analysés par SPIR dans de nombreux produits, avec des précisions très diverses. De nombreuses matières premières présentent des teneurs en lipides assez basses. Dans de telles situations, la sensibilité et la précision de la méthode de laboratoire de référence peuvent être insuffisantes pour permettre un étalonnage précis.

d / Glucides

Le dosage des glucides présente une grande importance en alimentation animale. Selon leur nature biochimique, les glucides jouent des rôles nutritionnels très différents. La région spectrale la plus utile se situe entre 2070 et 2110 nm où les glucides présentent une bande d'absorption forte due aux harmoniques des vibrations d'élongation des groupements OH et CO. Cette région permet de distinguer les sucres simples de leurs polymères. Le saccharose a été analysé dans de nombreux aliments destinés à l'homme ou à l'animal, avec une erreur s'étendant de 0,2 à 1 %. Il est plus facile de doser le saccharose ajouté dans l'aliment plutôt que ce même sucre sous forme native.

Tableau 1. Analyse du maïs ensilage par spectrométrie proche infrarouge.

N : nombre d'échantillons, Min et Max : valeurs minimale et maximale, SECV : erreur type de vérification croisée, r^2 : coefficient de détermination obtenu en vérification croisée.

Constituant (% MS)	N	Min %	Max %	SECV %	r^2
Protéines	1592	4	13	0,35	0,91
Sucres solubles	1287	0	21	1,16	0,95
Amidon	1937	0	53	1,60	0,98
MOD	2437	48	88	1,65	0,93
Cellulose	1676	9	38	0,84	0,96
NDF	1527	27	66	1,86	0,91
ADF	695	13	41	1,20	0,94
ADL	657	1	7	0,35	0,85

MOD : digestibilité pepsine-cellulase, NDF: Neutral detergent fiber, ADF : Acid Detergent Fiber, ADL : Acid Detergent Lignin.

Tableau 2. Etendue des erreurs types de prédiction (SEP) et coefficients de détermination (r^2) obtenus par SPIR appliquée aux aliments composés des ruminants.

Nature de l'analyse	SEP %	r^2
Humidité	0,22-0,66	0,80-0,94
Protéines brutes	0,50-1,10	0,84-0,99
Lipides	0,26-0,47	0,87-0,94
Cellulose brute	0,86-0,97	0,86-0,97
Cendres	0,45-0,95	0,49-0,95

Dardenne *et al* (2000) donnent des résultats analytiques portant sur l'analyse de l'ensilage de maïs. En ce qui concerne l'amidon, l'erreur type de vérification croisée (SECV) est de 1,6 % pour des concentrations s'échelonnant de 0 à 53 % (tableau 1).

La méthode de Van Soest est une méthode bien connue pour estimer les fibres alimentaires. Elle permet de mesurer le NDF (*Neutral detergent fiber*) et l'ADF (*Acid detergent fiber*). Le NDF est grossièrement la somme de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine, tandis que l'ADF regroupe seulement la cellulose et la lignine. On peut analyser ces paramètres avec une bonne précision par SPIR en particulier dans les aliments destinés aux ruminants qui sont naturellement riches en fibres. Le tableau 1 donne un exemple de résultats obtenus sur l'ensilage de maïs. Le tableau 2 présente quelques résultats d'analyse obtenus sur des aliments composés (Garrido-Varo 2000).

4.2 / Valeur nutritionnelle des aliments

On estime souvent les valeurs de critères nutritionnels des aliments tels que la digestibilité de la matière organique ou l'énergie métabolisable à partir de leur composition biochimique. Les modèles prédictifs utilisés sont généralement linéaires et reposent sur des équations de la forme :

Valeur nutritionnelle = constante + α [protéines] + β [lipides] + δ [glucides] +

dans laquelle α , β , δ ... sont les coefficients du modèle et [constituant] représente la concentration du constituant considéré.

Etant donné que la SPIR permet de doser individuellement chacun des constituants, il

est possible d'employer cette méthode analytique pour évaluer la valeur nutritive de la matière première ou du mélange étudiés.

Certaines études publiées ont été réalisées en suivant cette approche : on cherche d'abord à prédire chacun des constituants puis on applique un nouveau modèle linéaire pour déterminer la valeur nutritionnelle de l'aliment. Une autre approche consiste à prédire directement la valeur nutritionnelle à partir des spectres PIR. Cependant, les méthodes de référence permettant de mesurer la valeur nutritionnelle des aliments sont très longues à mettre en oeuvre et très onéreuses. Le principal problème est donc de disposer d'un nombre suffisant d'échantillons analysés pour étalonner les spectromètres PIR.

a / Monogastriques

Volailles

Valdes et Leeson (1989) ont analysé l'énergie métabolisable de 60 aliments composés destinés aux volailles. Ces aliments étaient préparés à partir de 18 matières premières et de mélanges vitaminiques et minéraux. Quarante échantillons étaient exploités pour l'étalonnage, et 20 autres pour la validation. Les valeurs de l'énergie métabolisable des aliments allaient de 1,986 à 3,250 kcal/g. Les erreurs de l'analyse étaient assez faibles et variaient entre 0,077 et 0,094 kcal/g. Le coefficient de détermination (r^2) des prédictions s'étendait de 0,93 à 0,95 en fonction du spectromètre PIR utilisé. Appliquée sur des échantillons résultant d'une production industrielle, l'analyse par SPIR restait satisfaisante avec des erreurs comprises entre 0,03 et 0,11 kcal/g. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont utilisé la SPIR pour prédire la matière sèche digestible (MD) ; l'énergie brute (EB), la teneur en protéines brutes et la teneur en lipides d'aliments destinés aux volailles (Valdes et Leeson 1990). L'étude portait sur 80 aliments (45 pour l'étalonnage et 35 pour la vérification). Les erreurs obtenues sur la collection de vérification étaient respectivement de 1,55 % ; 0,089 kcal/g ; 1,0 % et 0,77 % pour MD ; EB ; la teneur en protéines brutes et en lipides.

Porcs

En raison de la difficulté d'obtention de valeurs nutritionnelles de référence, très peu d'expériences ont été effectuées sur les porcs.

Czarnik-Matusiewicz et Korniewicz (1992) ont tenté d'utiliser la SPIR pour prédire la digestibilité *in vivo* des fibres brutes chez la truie. L'expérience a porté sur 90 truies nourries avec des aliments composés dans lesquels la proportion de fibres brutes était modifiée par l'ajout de farine de luzerne. Les auteurs ont appliqué une méthode de régression linéaire multiple pas à pas pour prédire la digestibilité *in vivo* des fibres brutes. Les 90 aliments disponibles étaient répartis en respectivement 60 et 30 échantillons pour l'étalonnage et la vérification. L'erreur SEP de

la digestibilité des fibres atteignait 3,38 %, avec un coefficient de corrélation égal à 0,83. Ces résultats étaient insuffisants pour permettre d'utiliser la méthode dans des applications industrielles.

b / Ruminants

La valeur nutritionnelle des aliments du ruminant est souvent mesurée par les méthodes indirectes qui sont corrélées avec les résultats des expériences *in vivo*. Ainsi, la proportion de l'aliment qui devient soluble sous l'action de la pepsine et de la cellulase peut être corrélée avec la digestibilité *in vivo* des fourrages (digestibilité pepsine-cellulase). D'autres méthodes indirectes reposent sur l'action de microorganismes présents dans le rumen. La méthode de Tilley et Terry (1963) est basée sur l'action *in vitro* des microorganismes du rumen (digestibilité *in vitro*). Enfin, la technique des sachets de nylon consiste à placer des sacs poreux contenant les aliments étudiés dans le rumen d'animaux vivants. Ici encore, la proportion de matière disparue (digestibilité *in situ*) peut être corrélée avec la digestibilité *in vivo*. Toutes ces méthodes indirectes sont naturellement plus simples et meilleur marché que les méthodes *in vivo* de référence. Elles restent cependant assez compliquées et longues à mettre en oeuvre. De nombreuses études ont porté sur l'analyse par SPIR de la digestibilité des aliments du ruminant. Dans de nombreux cas, la mesure de référence n'est pas le résultat d'un essai nutritionnel *in vivo*, mais une mesure indirecte reposant sur une des trois approches mentionnées (Davies et Giangiacomo 2000). Le tableau 1 donne des résultats obtenus par Dardenne *et al* (2000) en ce qui concerne la digestibilité pepsine-cellulase du maïs à ensiler. L'erreur type obtenue en vérification croisée (RMSECV) est de 1,65 %, avec un coefficient de détermination (r^2) de 0,93.

Conclusion

Dans l'industrie de l'alimentation animale, la SPIR apparaît comme une technique analytique très efficace. Cette technique est souvent employée « en ligne », dans le but de contrôler la production ou même de garantir une composition alimentaire correcte des aliments commercialisés. Les progrès de l'électronique, de l'informatique et de la chimie sont une source continue d'amélioration de cette méthode analytique. Les premières applications développées portaient principalement sur le dosage des constituants majeurs. Plus récemment, les analystes se sont intéressés à la prédiction directe par SPIR de la valeur nutritionnelle des aliments. Dans le futur, il sera sans doute possible de prévoir la réponse animale (taux de croissance, production laitière...) et d'établir directement les régimes des animaux à partir des spectres PIR des matières premières qui constituent l'aliment.

Références

- Banwell C.N., 1983. *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. McGraw-Hill, New-York, 338 p.
- Beale R., Jackson T., 1990. *Neural computing*. Adam Hilger, New-York, 240 p.
- Ben-Gera I., Norris K., 1968. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *J. Food Sci.*, 33, 64-67.
- Benson I.B., 1990. The characteristics and scope of continuous on-line near infrared instruments. In: *Bioteknisk Institut. International Symposium on NIR Spectroscopy*, 24-26 April 1990. Bioteknisk Institut, Kolding, Denmark, report NR:90-11.
- Bertrand D., Dufour E., 2000. *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Editions Tec & Doc, Paris, 566 p.
- Burns D.A., Ciurczak E.W., 1992. *Handbook of near infrared analysis*. Marcel Dekker, New-York, 681 p.
- Czarnik-Matusewicz H.W., Korniewicz A., 1992. Prediction of crude fiber in vivo digestibility by NIRS analysis in feeding the sows. In: Hildrum K.L., Isaksson T. et al (eds), *Near infrared spectroscopy. Bridging the gap between data analysis and NIR applications*. Ellis Horwood, 214-218.
- Dardenne P., 2000. Transferts d'équation d'étalonnage et mise en réseau d'instruments. In: Bertrand D. et Dufour E. (eds), *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, 371-379. Editions Tec & Doc, Paris.
- Dardenne P., Féménias N., 1999. Diode array near infrared instrument to analyse fresh forages on a harvest machine. In: Davies A.M.C. and Giangiacomo R. (eds), *Near Infrared Spectroscopy : Proceeding of the 9th Conference*. NIR Publications, UK, 121-124.
- Dardenne P., Sinnaeve G., Agneessens R., 2000. NIR-NIT Calibrations. Document édité par le Centre de Recherches agronomiques de Gembloux, 24 Chaussée de Namur, 5030 Gembloux (Belgique).
- Davies A.M.C., Giangiacomo R., 2000. Part: Animal and animal foods. *Near Infrared Spectroscopy : Proceeding of the 9th Conference*. NIR Publications, UK, 720-782.
- Garrido-Varo A., 2000. La spectroscopie proche infrarouge : une technique d'appui pour un "service intégral" en alimentation animale. In: Bertrand D. et Dufour E. (eds), *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, 473-493. Editions Tec & Doc, Paris.
- Geladi P., 1995. An overview of multivariate spectral data analysis. In: Davies A.M.C. and Williams P. (eds), *Near Infrared spectroscopy : The future waves*. NIR publications, Chichester, UK.
- Hart J.R., Norris K.H., Golumbic C., 1962. Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. *Cereal Chem.*, 39, 94-99.
- Kradjel C., Grummish U., Rachlis R., 1992. Raw material testing with near infrared: with crystal spectrometry, on site analysis of raw materials is faster and more efficient. In: Murray I. and Cowe I.A. (eds), *Making light work : advances in Near Infrared Spectroscopy*, 468-476. VCH, New-York.
- Norris K.H., Barnes R.F., Moore J.E., Shenk J.S., 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.*, 43, 889-897.
- Osborne B.G., Fearn T., Hindle P.H., 1993. *Practical NIR spectroscopy*. Longman Scientific & Technical, UK, 227 p.
- Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., 1996. *Introduction to spectroscopy*. Saunders Golden Sunburst Series; Harcourt Brace College Publishers, USA, 509 p.
- Tilley J.M.A., Terry R.A., 1963. A two-stage technique for in vitro digestion of forage. *J. Br. Grassl. Soc.*, 18, 104-111.
- Valdes E.V., Leeson S., 1989. Preliminary results on the use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRA) to measure metabolizable energy in poultry feeds. In: Iwamoto M. and Kawano S. (eds), *The Second International Near Infrared Spectroscopy Conference*. Korin Publishing, Japan, 116-118.
- Valdes E.V., Leeson S., 1990. Near Infrared Reflectance (NIRA) as a fast method to measure metabolizable energy (AMEn) and other quality parameters in poultry feeds. In: Biston R. and Bartiaux-Hill (eds), *Third international conference on Near Infrared Spectroscopy*, Agricultural Research Centre Publishing, Gembloux (Belgium), 187-189.
- Williams P.C., 1992. The Phil Williams' episode. *NIR news*, 3, 4-5.

Abstract

Near infrared spectroscopy: principles and applications in the animal feed industry.

Near infrared spectroscopy (NIRS) is very commonly used in numerous industries and is at the origin of a large number of analytical applications. This article presents in a synthetic way, the principle of NIRS and its applications in the feed industry. First, the fundamental bases of vibrational spectroscopy are simply presented. The principles of various commercial NIR instruments are then described. The statistical aspects

of calibration are also briefly explained. The last part is devoted to the analytical applications: analysis of the main components of foodstuff, assessment of their nutritional values (digestibility, metabolizable energy) for monogastric and ruminant animals.

BERTRAND D., 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *INRA Prod. Anim.*, 15, 209-219.

