

Spectroscopie optique pour caractériser l'état physiologique de plantes : quelques exemples

Véronique Bellon-Maurel, Pierre Grenier, Michel Crochon et Jean-Michel Roger

Quand les mystères sont très malins, ils se cachent dans la lumière, disait Jean Giono¹. Le poète avait raison et les scientifiques savent expliquer, mais aussi utiliser le fait que la « lumière », ou plus généralement le rayonnement électromagnétique, transporte les secrets de la matière.

Dans cet article, nous nous appuyons sur deux exemples de recherche pour expliquer comment la spectroscopie optique est devenue un instrument important pour qualifier la qualité et les caractéristiques de productions végétales. Après une introduction consacrée au rappel des bases physiques de la spectroscopie optique, nous analysons les potentialités de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR), puis nous présentons deux applications. La première concerne un système miniature de spectroscopie proche infrarouge développé par le Cemagref pour mesurer la maturité des fruits au champ, sous la forme d'un gant. Il a été mis en évidence que certaines bandes spectrales étaient plus sensibles que d'autres à la variabilité de température du fruit et que pour rendre l'étalonnage robuste, il fallait, en termes mathématiques, travailler orthogonalement au sous-espace de ces bandes spectrales.

La seconde application est mise en œuvre par le Cemagref pour évaluer la capacité de la technologie SPIR à estimer certains paramètres physiologiques des plantes, en particulier l'état hydrique. Les premiers résultats obtenus sur vigne suggèrent la faisabilité de cette application. Avec

en perspective, en élargissant le domaine spectral d'étude au visible et à l'ultraviolet, la détection précoce de certaines maladies.

Les bases physiques de la spectroscopie optique

L'interaction matière rayonnement

La « lumière » est la partie visible du spectre électromagnétique qui s'étend des rayons gamma aux ondes radio. Ces ondes se propagent à la vitesse de la lumière c avec des fréquences ν ou des longueurs d'onde λ qui varient en fonction du domaine spectral suivant la formule :

$$\nu = c / \lambda \quad (1)$$

L'énergie E transportée par cette onde est directement proportionnelle à sa fréquence :

$$E = h \cdot \nu \quad (2)$$

où h est la constante de Plank.

Les petites longueurs d'onde correspondent à des domaines très énergétiques (rayons gamma) et les grandes longueurs d'onde à des énergies plus faibles. Lorsqu'ils rencontrent la matière, ces rayonnements interagissent avec elle en lui transférant de l'énergie. Comme la molécule ou l'atome a des états énergétiques quantifiés, ces échanges d'énergie sont discontinus : ils n'ont lieu que

1. Dans « Ennemonde et autres caractères ».

Les contacts

Cemagref, UR Technologie et équipements des agro-procédés, BP 5095, 34033 Montpellier Cedex 1

lorsque l'énergie apportée par le rayonnement correspond exactement à l'énergie nécessaire à la molécule ou l'atome pour changer de niveau énergétique. Cet échange d'énergie se traduit par une absorption, c'est-à-dire la diminution de l'intensité du rayonnement qui a traversé ou qui a été réfléchi par la matière. Cette intensité absorbée est reliée à la concentration en composé absorbant dans la matière.

Selon l'énergie apportée, des phénomènes différents sont mis en jeu dans la matière. Pour le domaine spectral qui s'étend de l'ultraviolet (UV) à l'infrarouge moyen (IR), on observe 2 grands types d'interaction. Si l'énergie amenée par le rayonnement est élevée, comme c'est le cas dans le domaine UV de 200 à 380 nm ou visible de 380 à 780 nm, elle va permettre aux électrons engagés dans des liaisons moléculaires de changer de niveau énergétique, d'autant plus facilement s'il s'agit d'électrons délocalisés sur plusieurs atomes. Ainsi, la spectroscopie d'absorption UV-visible permet de quantifier des composés organiques contenant des cycles benzéniques, des liaisons doubles conjuguées comme dans les chromophores, ou certaines molécules inorganiques telles que les complexes métalliques. La spectroscopie proche infrarouge (SPIR) dont le domaine s'étend de 0,8 à 2,5 μm , et moyen-infrarouge (MIR) de 2,5 à 25 μm , correspondent à des changements de niveaux énergétiques touchant aux liaisons moléculaires. Les liaisons organiques présentant une forte polarisation et un grand déséquilibre massique sont les plus susceptibles d'être mises en vibration. Ceci permet d'estimer des teneurs en molécules contenant des liaisons C-H, N-H, O-H, c'est-à-dire la plupart des molécules biologiques. Dans la suite de cet article, nous nous centrerons sur les potentialités de la SPIR.

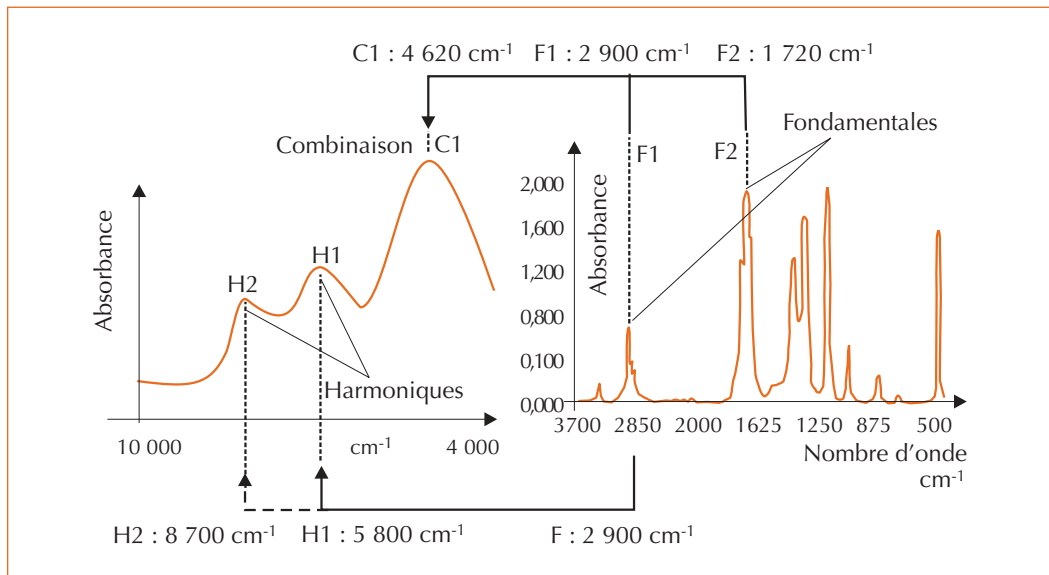
L'interaction entre la matière et le rayonnement électromagnétique optique ne se résume pas à des échanges d'énergie. Elle est également régie par les lois de l'optique géométrique qui modélisent la propagation du rayonnement au sein de la matière. C'est le cas des phénomènes de réflexion, réfraction, diffraction et diffusion optique, qui interviennent lors de toute propagation optique dans un milieu autre que le vide. Dans certains cas, on peut chercher explicitement à mesurer ces phénomènes pour avoir des informations sur le milieu traversé : mesure de l'indice réfractométrique pour connaître une teneur en sucres, mesure de la diffusion pour connaître la turbidité d'un milieu, etc. Dans la plupart des cas, ces phénomènes perturbent le signal en y ajoutant

tant une composante inconnue et variable : par exemple, en télédétection satellitaire, la diffusion par les aérosols, les particules et les molécules atmosphériques atténue le signal détecté par les capteurs ; en analyse de routine en laboratoire, les spectres sont fortement affectés par la granulométrie de l'échantillon, l'absorption s'accroissant lorsque la granulométrie augmente. Ces phénomènes doivent être pris en considération lors du développement d'applications de la SPIR.

Les potentialités de la SPIR

Les bandes d'absorption fondamentales des radiations infrarouges ont lieu dans le domaine du moyen infrarouge, faiblement énergétique, l'absorption correspondant à la mise en vibration de liaisons moléculaires. À chaque bande d'absorption fondamentale correspond une série d'harmoniques qui apparaissent à des fréquences multiples (double, triple, quadruple) de la fréquence fondamentale. Par exemple, pour une fondamentale dans le moyen infrarouge à 2 900 cm^{-1} de nombre d'onde (longueur d'onde : 3 448 nm) apparaissent dans le proche infrarouge une première harmonique à 5 800 cm^{-1} (1 724 nm) et une deuxième harmonique à 8 700 cm^{-1} (1 150 nm), comme indiqué en figure 1. De plus, les vibrations de plusieurs liaisons peuvent interagir dans une même molécule et donner lieu à des bandes de combinaison qui apparaissent à des fréquences combinaisons linéaires des fondamentales (figure 1). Le spectre proche infrarouge est constitué de ces bandes de combinaisons (dans les longueurs d'onde élevées) et d'harmoniques (faibles longueurs d'onde).

Ces bandes de combinaisons et d'harmoniques présentent des pics de plus faible intensité, ce qui montre que le « pouvoir d'absorption », aussi appelé « coefficient d'extinction », est plus faible que dans les bandes d'absorption fondamentales. Ce rayonnement est plus pénétrant que dans le moyen infrarouge : plusieurs centimètres de pénétration dans des produits secs en SPIR au lieu de quelques microns en MIR. Les bandes d'absorption de combinaisons et d'harmoniques sont plus larges que les bandes fondamentales. En conséquence, le proche infrarouge est bien adapté au dosage de composés majoritaires tels que l'eau, la matière grasse, les protéines, les glucides, à condition toutefois de mettre en œuvre des techniques mathématiques assez puissantes pour analyser convenablement le signal. Les limites de détection en SPIR sont relativement élevées par rapport au MIR.



◀ Figure 1 – Caractéristiques des bandes d'absorption dans les spectres moyen et proche infrarouge : cas des harmoniques (F : fondamentale, H1 : première harmonique, H2 : deuxième harmonique) et des fondamentales (F1 et F2 : fondamentales 1 et 2, C1 : combinaison).

La SPIR jouit d'avantages technologiques non négligeables : les composants optiques nécessaires à l'acquisition du spectre sont bien développés et disponibles à des coûts raisonnables en comparaison au MIR. Ils bénéficient des avancées faites dans le domaine de la vidéo (détecteurs CCD), des télécommunications (émetteurs lasers, fibres optiques...) et des composants militaires mis sur le marché.

Cette technologie est relativement récente dans ses applications aux produits biologiques. C'est dans les années 60 que Karl Norris, de l'USDA², a suggéré d'utiliser la radiation proche infrarouge pour obtenir une information sur la composition de produits alimentaires. À cette époque, en observant les spectres envahis par la bande d'absorption de l'eau, il pensait que seule l'eau pourrait être quantifiée (forte absorptivité, concentration élevée dans les produits biologiques). Cette contrainte a été levée par des traitements mathématiques dits « multivariés » permis par l'accroissement de la puissance de calcul des ordinateurs. Aujourd'hui, en plus de la mesure de teneur en eau qui est l'application la plus répandue dans l'industrie agroalimentaire, on sait mesurer la teneur des composants majeurs d'un produit biologique. La SPIR est couramment utilisée en laboratoire pour le contrôle de produits finis (mesure de la teneur en eau de grains de café, de céréales...), ou pour le contrôle en ligne de procédés de fabrication (teneur en humidité de produits secs, teneur en sucres dans les fruits

au Japon...). Aux États-Unis, c'est la méthode officielle de mesure de la teneur en protéines des céréales.

Le cœur d'un instrument SPIR est constitué d'une source de rayonnements électromagnétiques dans le domaine du proche infrarouge, d'un monochromateur qui sépare les longueurs d'onde de cette source, et d'un détecteur qui reçoit l'énergie infrarouge après interaction avec la matière analysée. Grâce aux progrès de l'opto-électronique, l'instrumentation a été miniaturisée et rendue plus robuste, permettant une utilisation dans des systèmes portables ou embarqués sur des équipements agricoles (mesure du taux de protéine sur céréales). La diffusion de tels systèmes est encore confidentielle, mais tous les grands constructeurs de moissonneuses batteuses et leurs équipementiers ont des programmes de recherche en cours et des systèmes en vente. Il faut les optimiser pour accroître la robustesse et la justesse de la mesure tout en diminuant le coût d'achat et de maintenance.

Pour réussir l'adaptation de la technologie SPIR au « terrain » (agriculture ou environnement), le Cemagref développe des recherches sur l'interaction entre le rayonnement électromagnétique et la matière biologique d'une part, et sur les méthodes mathématiques nécessaires à la robustesse des étalonnages et à la fiabilité du signal d'autre part. Les deux exemples suivants illustrent cette démarche.

2. United States Department of Agriculture.

La mesure au champ de la maturité des fruits

L'enjeu de la mesure de maturité

Dans le secteur des fruits et légumes, la maturité est le principal critère de décision pour déclencher la cueillette. Ce critère physiologique complexe s'exprime généralement par une teneur en sucres élevée, une acidité réduite et une régression des pigments chlorophylliens. Pour l'atteindre, il est intéressant de mesurer la teneur en sucres et le niveau d'acidité. Ces deux paramètres sont aussi les déterminants du goût du fruit, qui est un des principaux critères d'achat du consommateur.

3. FAIR PL 97-3399.

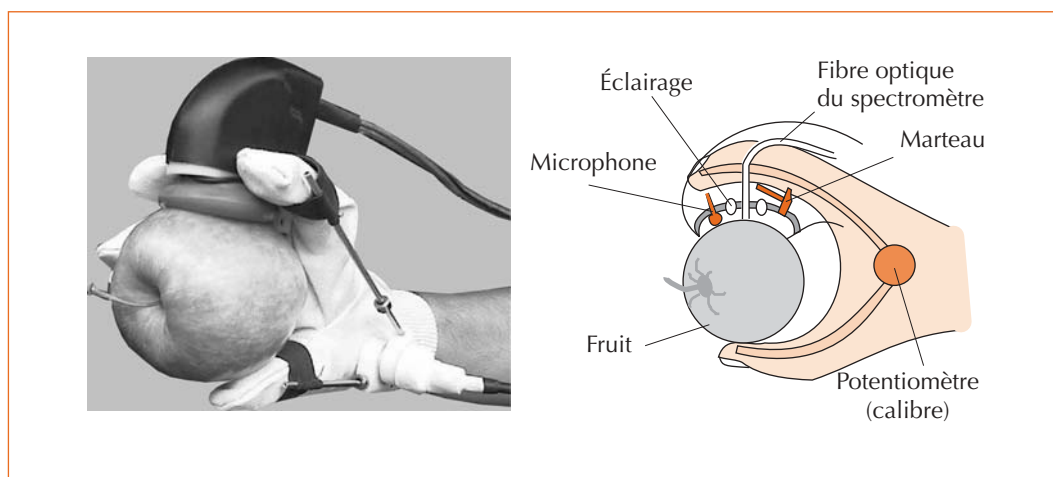
Depuis une quinzaine d'années, les chercheurs ont montré que le taux de sucres dans les fruits pouvait être mesuré en laboratoire de manière non destructive à travers la peau (Kawano *et al.*, 1989 ; Lavosz et Salgo, 1992 ; Bellon, 1992). Depuis, quelques sociétés japonaises ont développé des appareillages pour contrôler la teneur en sucres des fruits en ligne (Sumitomo Metal Mining, 1999, avec un système à laser) ou manuellement en supermarché (Anonyme, 1999). En France, le Cemagref tente de diviser le coût par dix par rapport aux systèmes japonais pour le contrôle en ligne (Roger *et al.*, 1998), et de mesurer simultanément sucres et acidité. Notre objectif est de fournir des systèmes de tri en ligne, fonctionnant à une vitesse de 10 fruits par seconde, pour la création de lots homogènes en qualité, mais aussi de développer des systèmes portables, pour le suivi au champ. Notre démarche a été basée sur l'analyse des contraintes du système, menant à des choix de technologie de

capteurs à état solide (sans pièce en mouvement). Ces capteurs étant plus « rustiques » que les spectromètres classiques, une recherche particulière en mathématiques a été nécessaire pour obtenir un traitement correct de l'information. Nous allons présenter le système portable, qui fait partie d'un ensemble de capteurs installé sur un gant, appelé gant instrumenté ou GLOVE.

GLOVE : un système miniature, portable et ergonomique pour mesurer la maturité des fruits au champ

Les premiers résultats ont été obtenus au cours du projet européen GLOVE³ (1998-2002), coordonné par le Cemagref et regroupant 5 partenaires. L'objectif de GLOVE était de mettre au point un gant équipé de capteurs pour mesurer de manière exhaustive les paramètres de qualité du fruit : teneur en sucres, teneur en chlorophylle, fermeté et taille. Le gant inclut un spectromètre proche infrarouge (pour mesurer les 2 premiers paramètres), un complexe acoustique marteau-microphone (fermeté) et un potentiomètre qui permet de mesurer la taille (figure 2). Le Cemagref a travaillé sur la mesure SPIR de la teneur en sucres. Le spectromètre utilisé est un Zeiss MMS1 (350-1 050 nm) équipé d'une fibre optique réceptrice de 20 cm. Le système d'éclairage a été optimisé pour consommer peu d'énergie tout en procurant une information de qualité : la lumière est fournie par des mini-lampes halogènes pulsées (4 W) fixées en couronne autour de la fibre réceptrice et mises directement au contact du fruit lors de la mesure. Ainsi toute la lumière collectée par la fibre a transité par le fruit.

► Figure 2 – GLOVE, gant instrumenté de mesure de la maturité de fruits qui comprend un spectromètre visible-proche infrarouge (sucres), un système acoustique (fermeté) et un potentiomètre (calibre).

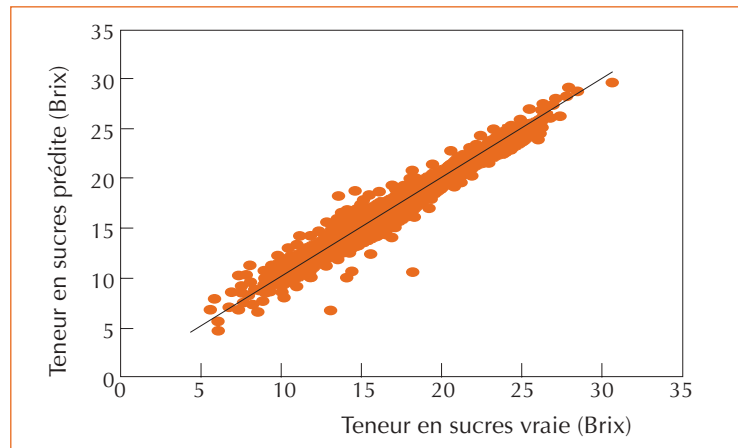


Pour prédire la teneur en sucres d'un fruit à partir de son spectre, il est nécessaire de réaliser un étalonnage. À chaque point du fruit où le spectre est mesuré, la chair est prélevée sous la peau et sa teneur en sucres est analysée par réfractométrie (valeur de référence). Un modèle linéaire reliant la valeur de référence à des paramètres extraits du spectre (comme l'absorbance à certaines longueurs d'onde) est alors élaboré, en général en utilisant des méthodes statistiques de traitement multivarié, telles que la régression aux moindres carrés partiels, très largement employée en SPIR. Lors du projet GLOVE, cette méthode d'étalonnage a été appliquée sur des pommes et sur des nectarines. La prédiction de la teneur en sucres est excellente (Bellon-Maurel et al., 2002) : l'écart standard de validation croisée (SECV)⁴, qui est une estimation optimiste de l'erreur de mesure (par convention, incertitude de mesure = 2 x SECV) est de 0,4 Brix⁵, c'est-à-dire que l'incertitude de mesure est de plus ou moins 0,8 Brix. L'erreur standard de prédiction ou SEP permet d'évaluer l'erreur attendue lors de la prédiction de la teneur en sucres sur un nouvel échantillon. Sur des grappes de raisins (6 variétés différentes, 540 échantillons), cette erreur est de 0,6 Brix (figure 3).

Du laboratoire au terrain, l'influence des facteurs perturbateurs

L'étape de la miniaturisation et de la portabilité ayant été franchie avec succès, nous nous sommes intéressés au problème de l'influence de facteurs perturbateurs qu'il est fréquent de rencontrer lors de mesures en conditions extérieures : lumière parasite, élévation de température du spectromètre et changements de température du fruit.

Dans un premier temps, un plan d'expérience a été mené afin de déterminer lesquels de ces facteurs étaient les plus influents (Hernández Sánchez et al., 2003). La lumière parasite n'a pas d'influence grâce à la mise en œuvre de lampes pulsées. Le facteur qui a le plus d'influence est sans conteste l'élévation de la température du spectromètre : une élévation de 10 °C se traduit par un décalage de 1,2 Brix dans la prédiction du taux de sucres (figure 4). Ce phénomène est assez linéaire. Il s'explique par des déformations de l'optique se traduisant par des décalages de spectres, et par des instabilités du détecteur. Cependant, étant suffisamment linéaire et ciblé sur le spectromètre, il peut être facilement corrigé par une mesure en continu de la température assortie



▲ Figure 3 – Taux de sucres prédit par spectroscopie proche infrarouge en fonction du taux de sucres vrai : application au raisin (abscisse : teneur en sucres vraie et ordonnées : teneur en sucres prédite).

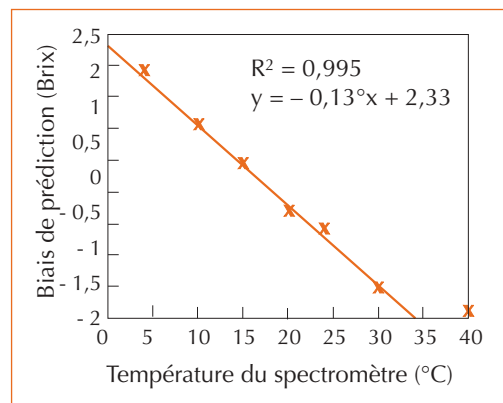
4. SECV : standard error in cross validation.

5. Le Brix est l'unité de teneur en sucres dans les fruits, équivalent à 1 % en poids.

d'une correction. Plus gênant est le décalage de la prédiction du taux de sucres en fonction de la température du fruit. En effet, il est impossible de mesurer à la volée la température d'un fruit, car les capteurs rapides ne travaillent que sur la surface, et la température en surface peut varier grandement d'une face à l'autre en fonction du soleil.

Si la variation de température d'un fruit se traduit par un décalage de la prédiction du taux de sucres, c'est qu'elle influe directement sur le spectre du fruit. D'un point de vue physique, cela s'explique aisément : l'augmentation de température change les fréquences des vibrations moléculaires et déplace les bandes d'absorption.

Ce décalage dû à la température du fruit peut être relativement important. Nous l'avons démontré en enregistrant le spectre infrarouge des fruits



◀ Figure 4 – Variation de la teneur en sucres de pommes prédite par spectrométrie proche infrarouge en fonction de la variation de la température du spectromètre ZEISS MMS1.

d'un même lot portés successivement à 8 températures différentes : la prédiction de chaque lot de fruits est décalée de manière régulière en fonction de sa température (figure 5a). La teneur en sucres moyenne prédite augmente linéairement de 0,7 Brix lorsque la température augmente de 10 °C (figure 5b). L'hystérésis présente sur cette courbe provient de la méthode pour faire varier la température du lot (en le plongeant dans un bain thermostaté) et de l'inertie thermique des fruits. En pratique, la température des fruits ne peut être ni réglée, ni facilement mesurée.

La naissance d'une problématique scientifique : la suppression de l'effet température par filtrage des spectres

Nous avons émis l'hypothèse que certaines bandes spectrales étaient plus sensibles que d'autres à la variation de température du fruit, et que pour rendre l'étalonnage robuste à la variation de température de l'échantillon, il fallait éliminer ces bandes spectrales du processus d'étalonnage, c'est-à-dire, en termes mathématiques, travailler orthogonalement à ce sous-espace. C'est ce qui a donné naissance à une méthode appelée EPO

pour « *external parameter orthogonalisation* » (Roger *et al.*, 2003 ; Chauchard *et al.*, 2003).

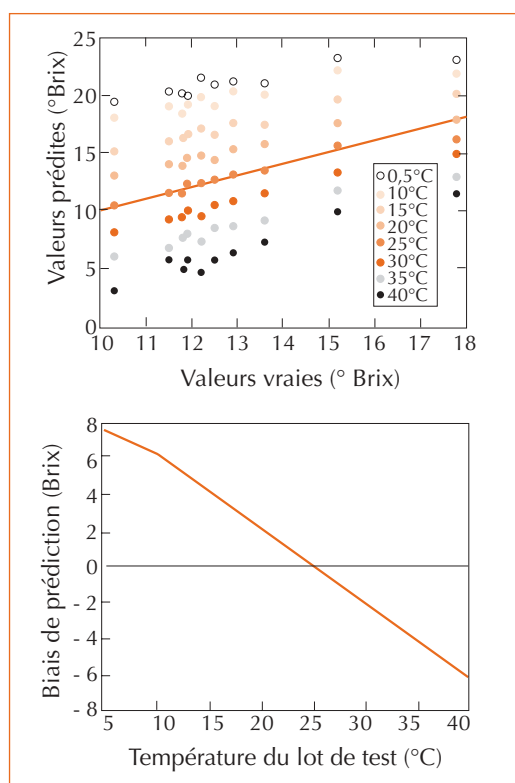
Dans un premier temps, nous recherchons le sous-espace de la « variation de température ». Pour cela, on cherche les composantes principales de l'ensemble des spectres obtenus sur le jeu de données précédent, obtenu en faisant varier les températures (figure 6) : ces composantes sont caractéristiques du sous-espace de la « variation de température ». On travaille ensuite systématiquement perpendiculairement à ce sous-espace, en projetant tous les spectres dans l'espace orthogonal : cet espace orthogonal ne doit plus contenir de variations dues à la température. D'excellents résultats ont été obtenus grâce à cette méthodologie développée par le Cemagref. En reprenant l'exemple précédent, les fruits du lot portés à différentes températures donnent des valeurs prédites proches les unes des autres et sans plus aucune « stratification » due à la température (figure 6a, à comparer à la figure 5a) : on réduit les décalages (le biais) à des valeurs négligeables qui ne sont plus reliées à la température (figure 6b, à comparer à la figure 5b).

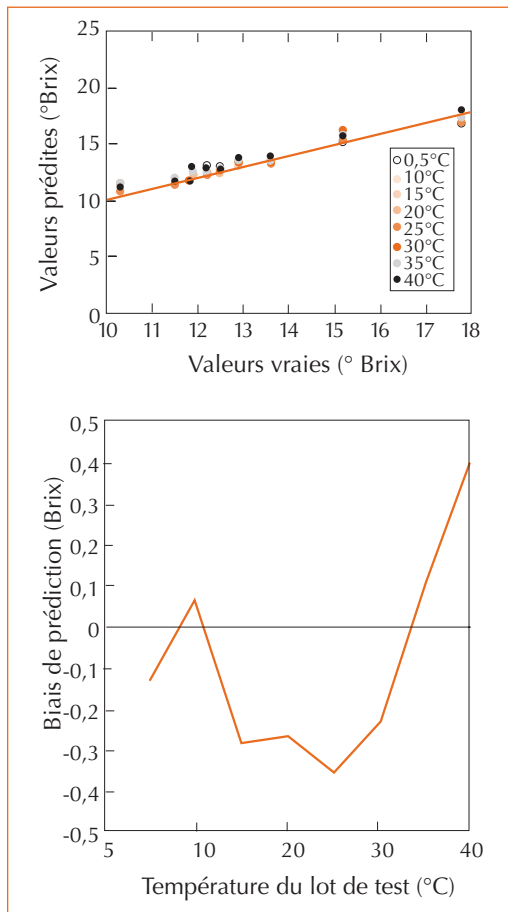
Cette avancée scientifique, au-delà de son intérêt pour la « température », peut trouver de nombreuses applications. Elle est totalement transposable à d'autres grandeurs d'influence. Elle pourrait faciliter le transfert d'étalonnage entre appareils. Elle illustre une voie de recherche engagée depuis 3 ans et qui consiste à étudier – dans le but de l'améliorer – la robustesse des étalonnages SPIR, approche indispensable à la mise au point d'outils de terrain.

Conclusion concernant la mesure au champ de la maturité des fruits

Cette démarche de recherche, engagée depuis une quinzaine d'années, décrit comment un problème de terrain peut générer des questions de recherche. Dans l'objectif d'améliorer sans cesse la performance des mesures non destructives de la maturité, d'autres pistes de développement des connaissances sont engagées : elles concernent une meilleure connaissance de l'interaction physique entre rayonnement électromagnétique et matière biologique, ou l'exploration de gammes spectrales complémentaires pour atteindre de nouvelles données telles que l'acidité (des résultats très positifs ont été obtenus sur raisin) ou l'état sanitaire du fruit. Le suivi de ces paramètres tout au long du développement de

► Figures 5a et 5b – Variation de la teneur en sucres de pommes prédite par technologie SPIR en fonction de la variation de la température des fruits.
a) Valeurs prédites pour un même lot de fruits porté à 8 températures différentes.
b) Évolution du biais en fonction de la température du lot de test.





▲ Figures 6a et 6b – Variation de la teneur en sucre de pommes prédite par spectrométrie proche infrarouge en fonction de la variation de la température des fruits après une correction par l'EPO.

a) Valeurs prédites pour un même lot de fruits portés à 8 températures différentes.

b) Évolution du biais en fonction de la température du lot de test avec un modèle corrigé avec l'EPO (attention l'échelle n'est pas la même qu'en figure 5b).

la plante permettrait une conduite des cultures encore mieux raisonnée. C'est le cas de l'approche « suivi du stress hydrique », récemment lancée par l'équipe et dont les premiers résultats s'allient à la bibliographie pour laisser présager de belles perspectives.

Application à la mesure du stress hydrique en viticulture

Le vignoble est conduit en situation de quasi-carence pour en maîtriser la croissance (nutrition azotée en particulier). Ceci nécessite des indica-

teurs plus discriminants que ceux permettant de conduire la culture au maximum de son potentiel photosynthétique. Un autre point très spécifique à la viticulture est le diagnostic hydrique de la culture. En effet, les exigences qualitatives nécessitent de cultiver la vigne en situation de contrainte hydrique modérée (Ojeda et al., 2001). Si une contrainte hydrique modérée de la vigne après la véraison est favorable à la maturation du raisin, un niveau de stress hydrique élevé peut nuire au potentiel phénolique de la vendange et induire un blocage de la maturation. Les conditions de stress hydrique subies par la vigne, notamment avant la véraison, peuvent induire une biosynthèse des tanins plus faible. L'état hydrique de la plante est donc un paramètre d'importance économique majeure pour la conduite de la vigne.

Objectif de l'étude

L'état hydrique de la plante est fourni par la mesure du potentiel hydrique foliaire grâce à la technique de la chambre à pression (dite de Scholander). Plus le stress hydrique est prononcé, plus la pression nécessaire pour faire sortir l'eau d'une feuille est forte. La méthode de référence aujourd'hui est la mesure du potentiel hydrique foliaire de base qui se fait avant le lever du soleil. Il serait utile de remplacer cette méthode destructive et fastidieuse par une méthode non destructive. Notre objectif est d'évaluer l'intérêt de la SPIR, sous forme d'un capteur portable, pour la détection du stress hydrique. Le but est de fournir au viticulteur – ou aux structures de conseil – un outil d'usage plus simple qu'une chambre à pression lui permettant de multiplier ses mesures. En accroissant ses connaissances sur l'état physiologique des cultures, le viticulteur est mieux à même d'adapter les techniques culturales.

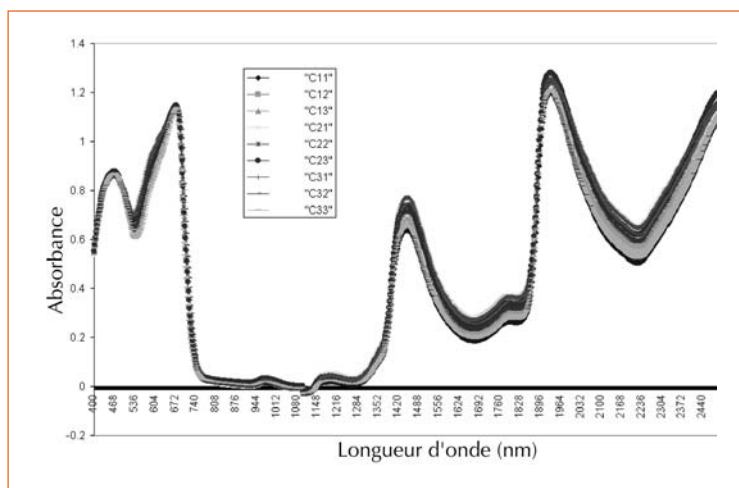
Utiliser les méthodes optiques pour détecter le stress hydrique n'est pas nouveau : de nombreux chercheurs ont travaillé sur le sujet en particulier en exploitant des images satellitaires : elles utilisent l'indice NDVI ou élaborent de nouveaux indices à partir des réflectances en infrarouge proche, moyen et thermique (Ceccato et al., 2001 ; Gillon et al., 2002). Ces mesures optiques peuvent aussi être combinées à des modèles pour rendre l'évaluation plus robuste (Nemadi et al., 2001 ; Lahoche et al., 1999). La mesure du stress hydrique par capteurs portables est également citée (Shakir Hanna et al., 1999). Mais en ce qui concerne la vigne, les capteurs optiques n'ont été que peu sollicités (Hall et al., 2002), les

6. En transfectance, le rayonnement traverse le produit, est réfléchi par un miroir puis retransverse le produit avant d'être détecté.

capteurs classiquement employés étant capacitifs. Pourtant, l'intérêt des capteurs optiques est qu'ils permettent de mesurer d'autres paramètres que le stress hydrique, tels que l'état de nutrition (Laurent, 1998) ou les maladies (Johnson *et al.*, 1996).

À l'instar des recherches faites sur la mesure du taux de sucres dans les fruits, notre objectif in fine est de mettre au point un capteur PIR de très bas-coût pour la détection du stress hydrique. La composition biochimique de la baie (sucres, acides malique et tartrique, composés phénoliques tels que tanins, proanthocyanidols, flavonols, anthocyanes...) est en relation étroite avec l'état hydrique de la plante, le microclimat des feuilles et des grappes (architecture, croissance, travaux en vert...) et le cépage. Qu'en est-il de la feuille ? Il semble raisonnable de tenter de corréler certains points caractéristiques du spectre de réflectance avec des teneurs en métabolites pris comme marqueurs de contrainte hydrique (Ourcival *et al.*, 1999 ; Méthy *et al.*, 1999 ; Méthy, 2000). Mais il serait plus simple de mettre en correspondance la signature spectrale d'une feuille avec une appréciation globale de contrainte hydrique, comme par exemple un potentiel hydrique. L'approche préliminaire de cette étude de faisabilité est présentée ici.

▼ Figure 7 – Absorbance en transfectance (double transmission) de feuilles fraîches de Chardonnay, entre 400 et 2 500 nm, avec un NIR System 6500.



Des spectres PIR de feuilles de vigne, très encombrés...

Avant toute étude, il faut, comme le dit le célèbre spectroscopiste Tony Davies, « voir les données », une très bonne analyse statistique ne remplaçant pas la vérification visuelle des spectres.

Pour cela, 9 feuilles de Chardonnay (3 feuilles x 3 ceps) issues de l'Écotron de Montpellier sont analysées en « transfectance »⁶ entre 400 et 2 500 nm sur un NIRSystem 6500.

Puis les feuilles sont séchées dans une étuve pendant 48 h à 55 °C, broyées finement, puis analysées à nouveau par le NIRSystem 6500.

Ces spectres sont comparés qualitativement avec des spectres d'absorbance de référence de corps purs, tels que eau, fructose, glucose, saccharose, amidon et cellulose.

Les 9 spectres de Chardonnay sont présentés en figure 7. Le spectre proche infrarouge des feuilles fraîches rappelle fortement le spectre bien connu de l'eau.

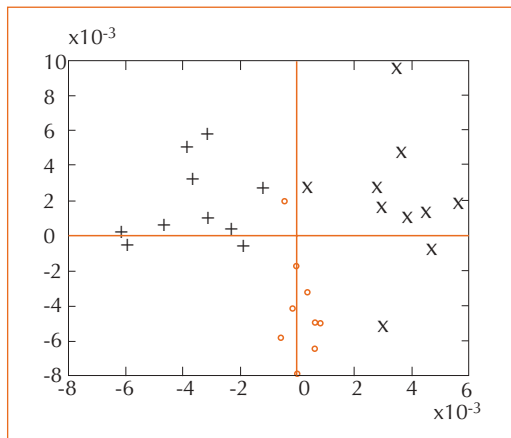
Les spectres des poudres des feuilles séchées ne révèlent plus le spectre de l'eau, mais s'apparentent plutôt à un mélange de formes issues des spectres des sucres solubles, de l'amidon et de la cellulose. Ceci rejoint les conclusions de Fourty *et al.* (1996) sur des études spectrométriques similaires menées sur des feuilles issues de 43 espèces différentes.

Ces spectres sont ensuite comparés avec des spectres, obtenus dans les mêmes conditions, de feuilles de cépage Airen – dont le comportement au stress hydrique est très différent. Aucune différence visuelle n'apparaît sur les spectres. Comme on le constate fréquemment en SPIR, l'analyse visuelle est insuffisante pour tirer des conclusions. Une analyse plus poussée utilisant des méthodes multifactorielles est donc nécessaire.

... qui se clarifient par analyse factorielle

Un nouveau jeu de données a été considéré pour se recentrer sur une seule variété et inclure une variabilité de contrainte hydrique. Un ensemble de 29 feuilles de Syrah a été cueilli le 24/7/03 à 12 h 30 à l'Écotron de l'Agro de Montpellier, sur 3 pieds dont les potentiels de base étaient respectivement de -3,0 bars (10 feuilles classe A), -4,2 bars (9 feuilles classe B), et -7,3 bars (10 feuilles classe C). Une analyse factorielle discriminante (AFD) pas à pas a été paramétrée pour prédire l'appartenance de chaque feuille à chaque classe. Les entrées de cette AFD sont les spectres PIR, et les sorties sont les 3 classes A, B, et C.

L'erreur de classification obtenue par validation croisée est de 7 %. La séparation entre les classes apparaît nettement sur le premier plan factoriel



▲ Figure 8 – Premier plan factoriel de l'AFD sur les 29 spectres 400 – 2 500 nm, un spectre par feuille de vigne, selon les 3 classes de stress hydrique (+, o, x), montrant la séparation entre les classes.

de l'AFD (figure 8). Les résultats sont très comparables que l'on soit en transfectance ou en réflectance.

Conclusion à propos de la caractérisation de l'état hydrique en viticulture

Ces premiers résultats confirment la bibliographie quant à la sensibilité de la SPIR pour caractériser l'état hydrique de la plante.

La voie est ouverte pour la mise au point d'un capteur à base de SPIR, mais avec d'innombrables questions : comment réduire le spectre à quelques longueurs d'onde caractéristiques de la grandeur tout en étant robustes aux variations « environnementales » ainsi qu'aux variations de

cépages ou de stades physiologiques ? Quelle est la représentativité au niveau d'un pied de vigne d'une mesure spectroscopique faite en un point d'une feuille ? Quelle est la meilleure échelle en terme de sensibilité, de robustesse et de coût de la mesure ? Nul doute que l'expérience acquise dans la mise au point de capteurs peu coûteux pour le sucre, appuyée sur des collaborations avec des spécialistes de télédétection du Cemagref et de l'INRA sera indispensable à ce nouveau challenge.

Synthèse et perspectives

Ces deux exemples ont montré comment la spectroscopie proche infrarouge pouvait être mise en œuvre dans des approches de terrain et quelles questions scientifiques et technologiques cela générerait. Du fait de la disponibilité croissante de matériels de plus en plus performants, la technologie SPIR évolue sans cesse et ouvre de nouvelles voies de recherche. Au Cemagref, celles-ci concernent l'exploration des potentialités de la vision hyperspectrale en visible/proche infrarouge, et l'amélioration de la robustesse des modèles de prédiction basés sur la SPIR. Nos recherches les plus récentes prennent en compte la continuité spatiale ou temporelle des mesures pour les rendre plus robustes (Zeaiter et al., 2003) ou utilisent la fusion de données provenant de plusieurs capteurs spectroscopiques complémentaires (Roussel et al., 2003). Les applications se tournent résolument vers l'amont des filières, à savoir la production agricole – qui est à la base de l'élaboration de la qualité de produits alimentaires tels que les fruits et le vin – et vers l'environnement avec l'objectif de prévenir les pollutions. □

Remerciements

Nous tenons à remercier le Professeur Alain Deloire et son équipe (Agro de Montpellier), ainsi qu'Éric Lebon (INRA/LEPSE), pour leur collaboration.

Résumé

Un système miniature de spectroscopie proche infrarouge (SPIR) a été développé par le Cemagref pour mesurer la maturité des fruits au champ, sous la forme d'un gant. Il a été mis en évidence que certaines bandes spectrales étaient plus sensibles que d'autres à la variabilité de température du fruit et que, pour rendre l'étalonnage robuste, il fallait développer des méthodes mathématiques de filtrage permettant de travailler orthogonalement au sous-espace de ces bandes spectrales. Au-delà de cet exemple, le Cemagref évalue la capacité de la technologie SPIR à estimer certains paramètres physiologiques des plantes, en particulier l'état hydrique. Les premiers résultats obtenus sur vigne confortent la bibliographie et suggèrent la faisabilité de cette application.

Abstract

A miniature system of near infrared spectroscopy (NIRS) was developed by Cemagref for measuring the maturity of fruits in the field, shaped as a glove. It could be shown that some spectral bands were more sensitive than others to the variation of temperature of the fruit. For making the calibration more robust, it proved to be helpful, said in mathematical terms, to process spectral data in an orthogonal way to the sub-space of the sensitive spectral bands. Beyond this example, Cemagref evaluates the potential of SPIR technology to assess some plant physiological parameters, especially their hydric status. First results obtained with grapevine confirm bibliographic data and suggest that this application is feasible

Bibliographie

- Anonyme, 1999, Tabletop fruit taste analyzer, *NIR News*, vol. 10, n° 2, p. 13.
- BELLON-MAUREL, V. *et al.*, 2002, GLOVE : an instrumented glove to non destructively and rapidly assess fruit quality, in *6th International symposium on fruit nut and vegetable production engineering*, ATB Agrartechnik Bornim, Potsdam, Allemagne, Zude, M. *et al.*, p. 597-602
- BELLON-MAUREL, V., 1992, *Application de la spectroscopie proche infrarouge au contrôle en ligne de la qualité des fruits*, thèse Doctorat, spécialité Génie des procédés, Institut National Polytechnique de Toulouse, 250 p.
- CECCATO, P. *et al.*, 2001, Detecting vegetation leaf waer content using reflectancei the optical domain, *Remote Sensing of Envir.*, 77, p. 22-33.
- CHAUCHARD, F. *et al.*, Improving the Robustness of Near Infrared Spectroscopy with regard to sample temperature; Application to SSC prediction in fruits, *submitted to J. of Near Infrared Spectroscopy*, 20 octobre 2003.
- FOURTY, Th. *et al.*, 1996, Leaf Optical Properties with Explicit description of its biochemical composition: direct and inverse problems, *Rem Sens Envir.*, 56, p. 104-117.
- GILLON, D. *et al.*, 2002, *Teneur en eau dans les feuillages et caractéristiques spectrales grâce à l'utilisation de la spectrométrie NIR*, 4th International Conference on Forest Fire Research, 18-23 November 2002, Luso-Coimbra, POR, 13 p.
- HALL, A. *et al.*, 2002, Optical remote sensing applications in viticulture – a review, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, p. 36-47.
- HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, N. *et al.*, 2003, Robustness of models based on NIR spectra for sugar content prediction in apples, *J. Near Infrared Spectroscopy*, vol. 11, n° 2, p. 97-107.
- JOHNSON, *et al.*, 1996, Airborne imaging aids vineyard canopy evaluation, *California Agriculture*, 50/4, p. 14-18.

KAWANO, S. et al., 1989, Measurement of Sugar content in intact peaches by NIRS, in *Second International Near Infrared Spectroscopy Conference, National Food Research Institute, Tsukuba, Japon*, Iwamoto, M.; Kawano, S., p. 343-352.

LAHOUCHE, F. et al., 1999, *Hydric stress detection by estimating actual evapotranspiration with satellite acquisitions in semi-arid catchments, Proceedings of the European Symposium on satellite remote sensing (EUROPTO and SPIE), Conference on Remote Sensing for Earth Science Applications, Florence, Italy, September 1999.*

LAURENT, F., *Analyse des possibilités de diagnostic de l'état de nutrition azotée et de stress hydrique par signature de fluorescence et test de robustesse de l'indicateur – Application sur blé, maïs, vigne*, Dossier n°98-05-1, <http://www.acta.asso.fr/cr/cr9805.htm>

LAVOSZ, T. ; SALGO, A., 1992, Investigation of the apple quality by near infrared technique, in *Near Infrared Spectroscopy - bridging the gap between data analysis and NIR applications*, Norwegian Food Research Institute, Hildrum, K. et al., p. 365-370.

MÉTHY, M. et al., 1999, Remote sensing of canopy photosynthetic performances: two complementary ways for assessing the photochemical reflectance index, *Photosynthetica*, vol. 37, n° 2, p. 239-247.

MÉTHY, M., 2000, Analysis of photosynthetic activity at the leaf and canopy levels from reflectance measurements : a case study, *Photosynthetica*, vol. 38, n°4, p. 505-512.

NEMANI, R. ; JOHNSON L. ; WHITE, M., 2001, Adding science to intuition: application of remote sensing and ecosystem modelling to vineyard management, *The Australian Grapegrower and Winemaker, Annual Technical Issue*, p. 45-47.

OJEDA, H. et al., 2001, Influence of water deficits on grape berry growth, *Vitis*, vol. 40, n° 3, p. 141-145.

OURCIVAL, J.-M. et al., 1999, Exploring the relationships between reflectance and anatomical and biochemical properties, *Quercus Ilex leaves, New Phytology*, vol. 143, p. 351-364.

ROGER, J.-M. et al., 1998, Real-time NIR sensor to sort fruit and vegetable according to their sugar content, in *Sensoral 98, Sensing Quality of Agricultural Products, Montpellier*, Cemagref, Bellon-Maurel, V. et al., p. 533-544.

ROGER, J.-M. et al., 2003, External Parameter Orthogonalisation of PLS : Application to temperature-independent measurement of sugar content of intact fruits, in NEAR-2003, *Stretching the NIR spectrum to the limit, 11th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy, University of Cordoba, Cordoba, Spain*, Garrido-Varo, A. et al., p. 78.

ROUSSEL, S. et al., 2003, Fusion of aroma, FT-IR and UV sensor data based on the Bayesian inference, application to the discrimination of white grape varieties, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.65, n° 2, p. 209-219.

SHAKIR HANNA et al., 1999, Spectral characterization of water stress impact on some agricultural crops: III. Studies on Sudan grass and other different crops using handheld radiometer, in Proc. SPIE, vol. 3868, p. 154-166, *Remote Sensing for Earth Science, Ocean, and Sea Ice Applications*, Giovanna Cecchi; Edwin T. Engman; Eugenio Zilioli; Eds.

Sumitomo Metal Mining, 1999, *Non destructive sugar content measuring apparatus*, Brevet USA n° 5 708 2712.

ZEAITER, M. et al., 2003, The robustness of models developed by multivariate calibration - Part I : Measurement of Robustness, accepted for publication in *Trends in Analytical Chemistry*.