

Pratique de l'IRTF dans les laboratoires d'œnologie

DUBERNET M.

Laboratoire Dubernet, 9, quai d'Alsace, 11100 Narbonne

La spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est apparue dans le domaine de l'analyse œnologique voici maintenant cinq années. Le succès de cette méthode mise au point en France, et qui est maintenant appliquée dans le monde entier, est à la mesure des polémiques diverses qu'elle suscite. Afin d'essayer d'apporter un peu de clarté dans ces débats, il nous est apparu que le moment était venu de faire le point sur ses fondements, sur ce qu'elle apporte et sur ses limites.

1 Les bases fondamentales de l'analyse par IRTF

Un appareil IRTF est constitué de deux entités fondamentalement différentes. La première est un spectrophotomètre moyen infrarouge à transformée de Fourier qui permet d'acquérir en quelques secondes le spectre moyen infrarouge du vin ou du moût à analyser. La seconde est un outil de calcul qui autorise l'analyse du spectre obtenu et la recherche des informations qualitatives ou quantitatives qui s'y trouvent, en appliquant des modèles obtenus avec des données de base qui ont été introduites au cours d'une phase d'apprentissage du système. Aujourd'hui, la partie spectrophotométrique est, en général, bien maîtrisée par les constructeurs. Le problème le plus ardu qui a été posé en œnologie sur ce point concerne la qualité du circuit hydraulique. En premier lieu, il a fallu trouver des cellules de mesure qui ne soient pas attaquées par le vin ou le moût. Ce problème a été convenablement résolu par tous les constructeurs. Il est indispensable, en second lieu, d'éviter les interférences qui peuvent être apportées par le gaz carbonique dissous. Ce point fait l'objet de solutions différentes, plus ou moins efficaces. Globalement, les appareils actuellement présents sur le marché sont techniquement satisfaisants et à même d'assurer l'acquisition des spectres infrarouge des vins et des moûts dans de bonnes conditions. En revanche, la deuxième partie de l'analyse pose nettement plus de problèmes et il est important que chaque analyste désirant utiliser l'IRTF en soit pleinement conscient. C'est ce point qui est développé ci-dessous.

2 Une science récente : la chimométrie

D'une manière générale, le spectre moyen infrarouge d'un vin ou d'un moût contient des informations présentant un intérêt analytique dont l'extraction n'est pas immédiate. Celle-ci demande, dans la plupart des cas, un traitement mathématique qui peut être très complexe. L'ensemble des moyens qui peuvent être mis en œuvre pour rechercher ces informations analytiques fait partie d'une science nouvelle : la chimométrie. Celle-ci a été définie en 1996 par GELADI comme "la science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques qui vise à extraire l'information utile présente dans des données de mesures chimiques". La chimométrie inclut ainsi les méthodes statistiques adaptées au traitement des données spectrales.

Deux objectifs principaux peuvent être recherchés par les analystes :

- La description globale du produit analysé (méthode exploratoire). Il s'agit de classer les spectres par familles préalablement définies. Une application en œnologie peut être de définir la matrice d'un produit présenté à la mesure. Un tel outil peut

ainsi permettre de déterminer si ce produit est un moût, un moût en fermentation, un vin sec, un vin liquoreux ou un vin doux naturel. Nous verrons plus loin combien un tel classement peut être important.

- Une approche prédictive qui permet, à partir de données de référence préalablement acquises (calibrage), de trouver des valeurs analytiques de composés ou d'indices propres à la composition d'un vin ou d'un moût inconnu. C'est surtout cette deuxième approche qui est actuellement utilisée par les laboratoires dans la mesure où elle permet de substituer l'IRTF aux outils analytiques classiques.

Les méthodes chimométriques applicables, pour arriver aux résultats ci-dessus décrits, sont extrêmement nombreuses et leur mise en œuvre reste une affaire de spécialiste. Elles peuvent être classées en deux grands groupes selon qu'elles reposent sur un modèle linéaire ou non linéaire. Elles vont d'outils statistiques simples tels que l'analyse en composantes principales (ACP) à des outils d'une grande complexité mathématique et d'utilisation tels que les réseaux neuronaux. Nous renvoyons le lecteur qui souhaite plus d'informations sur ce sujet à l'excellent ouvrage de D. BERTRAND et E. DUFOUR : "La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques" aux Editions TEC & DOC.

Si, comme nous l'avons vu plus haut, tous les constructeurs proposent des outils de mesure optique dont les performances sont satisfaisantes, les moyens de standardisation de cette mesure, les outils de traitement des données du spectre et la qualité des outils de chimométrie offerts aux utilisateurs, sont beaucoup plus soumis à variabilité. Les difficultés rencontrées par les laboratoires sont essentiellement liées à ces points. De même, une partie des polémiques qui sont nées autour de la méthode y trouve son origine. Nous nous attacherons, dans la suite de cet exposé à décrire les points les plus sensibles afin de permettre au lecteur de mieux comprendre l'importance de la qualité du traitement chimométrique utilisé pour la lecture des données spectrales d'un vin ou d'un moût.

3 Les étapes de l'analyse du spectre moyen infrarouge

Il convient de prendre conscience de la très grande complexité des informations contenues dans le spectre moyen infrarouge d'un vin ou d'un moût qui est due à plusieurs éléments :

- La composition organique et minérale de ces produits est l'une des plus riches de celles qui peuvent être rencontrées dans le domaine de l'agroalimentaire.
- Les zones d'absorption de chaque molécule organique dans le moyen infrarouge sont multiples en raison, en particulier, d'importants phénomènes de résonance.
- Il existe entre les différents composés organiques des interactions qui sont à l'origine de l'effet matrice que nous évoquerons plus loin et qui sont impossibles à modéliser.

Ainsi, contrairement à d'autres analyses spectrophotométriques, il est pratiquement toujours impossible d'appliquer, pour l'analyse IRTF des moûts et des vins, des connaissances théoriques sur l'absorption de tel ou tel composé. Seul le recours à une approche expérimentale peut être envisagé. Ce point devient une caracté-

téristique fondamentale de la méthode qui repose ainsi sur une approche strictement mathématique dont la performance sera déterminante pour la qualité finale du résultat. La procédure de cette approche expérimentale de calibrage consiste à multiplier l'acquisition de spectres d'un maximum de variétés d'échantillons de valeur précisément connue pour le composé ou l'indice à analyser, avant d'appliquer les méthodes statistiques mathématiques. Il est indispensable de comprendre que cette étape est fondamentale pour obtenir un bon outil d'analyse. Non seulement, l'opérateur doit disposer d'un nombre d'échantillons représentatifs aussi élevé que possible, mais il doit mettre en œuvre les méthodes chimométriques les plus adaptées et, si possible, faire une analyse comparative critique des résultats obtenus avec plusieurs d'entre elles. Une telle approche doit toujours être complétée par une comparaison statistique très large des résultats donnés par le modèle retenu avec ceux de méthodes analytiques de référence. Plusieurs milliers de déterminations peuvent être indispensables pour cette dernière étape. Un calibrage est donc une démarche lourde et délicate qui demande du temps et des moyens importants. C'est donc globalement un leurre de laisser croire que tout laboratoire peut mettre en œuvre une telle approche en se contentant de réaliser un nombre de spectres limité, en sous-traitant l'analyse chimométrique et en faisant une approche comparative sur un nombre réduit d'échantillons.

Pour aller plus loin et mieux comprendre la difficulté de l'approche, il convient de préciser les points critiques suivants :

3.1- Comportement de l'analyte

Tous les composés organiques du vin ne vont pas avoir le même comportement analytique pour plusieurs raisons :

- En premier lieu, il est évident que les composés à concentration élevée (au dessus de 1 g/L par exemple) ont de fortes chances d'être plus faciles à doser car ils entraînent des phénomènes d'absorptions plus lourds.
- En deuxième lieu, les capacités d'absorption caractéristiques d'un composé vont dépendre de sa constitution moléculaire. Certaines molécules, comme le dioxyde de carbone par exemple, vont avoir une forte capacité d'absorption dans le moyen infrarouge alors que d'autres molécules auront des absorptions beaucoup plus modestes.
- Enfin, l'influence des autres composés du vin (effet matrice) est une donnée essentielle. On comprend facilement que si les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques d'un composé se superposent à celles de l'eau ou de l'éthanol qui sont présents en très forte proportion, la sensibilité de mesure pour ce composé va se trouver très affaiblie. De même, il existe des phénomènes d'interactions entre les constituants qui peuvent déplacer les bandes d'absorptions.

On admettra facilement que, là encore, les connaissances théoriques ne sont pas de grande utilité et que seule, l'approche expérimentale peut permettre de déterminer si un composé donné peut être facilement dosé par IRTF ou non. À titre d'exemple, le dosage des sucres se montre délicat pour des valeurs inférieures à 1 g/L, alors que celui de l'azote ammoniacal (NH_3) est accessible à partir de 10 mg/L.

Ces données sur le comportement des analytes permettent de comprendre qu'il est plus facile d'analyser un composé à forte concentration, présentant dans le moyen infrarouge des absorptions bien caractéristiques, en dehors des zones d'absorption de l'eau et de l'éthanol et peu sensibles aux effets matrice, qu'un composé présentant des caractéristiques opposées. Ainsi l'éthanol sera beaucoup plus facile à analyser que l'éthanal. De même il devient évident que, plus un composé est difficile d'accès, plus le travail de calibrage sera compliqué et devra être soigné. En particulier, l'échantillonnage initial devra être suffisamment important et parfaitement sélectionné, les outils chimométriques seront plus puissants et plus pertinents et le

travail de comparaison avec les méthodes de référence devra être mené sur un nombre plus élevé d'échantillons.

3.2- Extrapolation

Il s'agit là d'un point essentiel et mal connu : dans le travail de calibrage, il n'est pas possible de compter sur une capacité d'extrapolation du système. Ainsi, si l'échantillonnage initial ne couvre pas la totalité du domaine d'analyse revendiqué de façon égale, les résultats obtenus dans les zones les moins riches en informations initiales montreront des déficiences. De même s'il existe un effet matrice significatif tel que celui souvent apporté par les composés phénoliques, il est indispensable que des vins de toutes concentrations en composés phénoliques soient présents à tous les niveaux de la gamme. Dans le cas contraire, la partie de gamme non couverte par toutes les valeurs possibles de composés phénoliques sera plus sensible aux effets matrice et ne sera pas fiable.

3.3- Les effets matrice

Il s'agit là d'un point fondamental pour la mise en œuvre de l'IRTF. Nous avons vu plus haut que l'effet matrice était dû aux autres composés présents dans le milieu à analyser et absorbant dans le moyen infrarouge. Un effet matrice n'est cependant pas un problème incontournable. Tout calibrage peut prendre en compte de nombreux effets matrice. Pour cela, comme dans les systèmes experts, il convient d'avoir apporté l'information nécessaire afin que l'outil puisse, par apprentissage, mesurer l'impact de l'effet matrice sur le dosage du composé recherché. L'effet matrice pourra ainsi être éliminé par référence à la valeur de calibrage lorsqu'il sera retrouvé dans un échantillon inconnu. À ce stade, il est facile de comprendre que plus on aura présenté de matrices différentes lors d'un calibrage, plus celui-ci sera robuste et saura s'affranchir des effets matrice. C'est l'un des points les plus forts de la méthode IRTF. Il existe cependant une limite à son utilisation. En effet, plus on introduit de capacité de gestion de l'effet matrice dans un calibrage, plus celui-ci perd en sensibilité et en précision. Un choix devra donc être fait par l'opérateur développant un calibrage pour trouver le bon équilibre entre robustesse, sensibilité et précision. Là encore, l'approche devient vite très complexe et ne peut être envisagée sans la mise en œuvre de moyens importants.

Dans la pratique, en œnologie, il n'apparaît pas possible de travailler avec des calibrages couvrant toutes les matrices pouvant être rencontrées. L'état des connaissances permet cependant, pour les déterminations les plus courantes, de regrouper les vins et les moûts en cinq matrices fondamentales :

- les moûts non fermentés,
- les moûts en fermentation,
- les vins secs ou faiblement sucrés,
- les vins liquoreux,
- les vins doux naturels.

En revanche, il convient de signaler que les effets matrices engendrés par des cépages différents, la couleur du vin ou l'origine géographique sont, en général, levés par des calibrages bien menés.

3.4- Valeurs de référence

La qualité d'un travail de calibrage dépend aussi de celle des valeurs de référence qui sont utilisées. L'exemple de l'acide gluconique est révélateur. La méthode enzymatique de dosage de l'acide gluconique n'est pas fiable. Elle présente un manque de robustesse qui n'avait pas été signalé et qui est probablement dû à des effets matrice non identifiés. Les premières calibrations IRTF ont été faites avec des résultats obtenus par cette méthode et, bien que l'acide gluconique présente des caractéristiques d'absorption très qualitatives, les résultats obtenus par IRTF se

sont avérés mauvais. De nouvelles calibrations ont été réalisées depuis en utilisant, pour les valeurs de référence, l'électrophorèse capillaire et les résultats donnés par IRTF sont aujourd'hui d'une grande qualité.

Tous ces éléments montrent clairement qu'un travail de calibrage ne peut être réalisé à la légère. Si la démarche est relativement simple pour les composés les plus facilement analysables tels que l'éthanol ou l'acidité totale, les choses se compliquent très rapidement pour des composés plus difficiles d'accès. La prise de conscience de ces éléments est, à l'évidence, encore trop partielle de la part de la majorité des utilisateurs et reste souvent difficile en raison d'une communication souvent incomplète, voire volontairement erronée.

4 Situation du marché

Comme nous l'avons dit plus haut, la plupart des constructeurs proposent des spectrophotomètres moyen infrarouge à transformée de Fourier utilisables en œnologie. Il reste que l'acquisition d'un tel appareil ne constitue qu'une première étape très limitée du processus de mise en œuvre de l'IRTF dans un laboratoire d'œnologie. La deuxième étape consiste à lui permettre de fonctionner avec des calibrages adéquats. Là, commencent les difficultés. Trois situations peuvent se rencontrer :

- le laboratoire peut développer ses propres calibrages ; plusieurs l'ont fait avec succès. Il reste que, comme nous l'avons vu plus haut, il s'agit d'une entreprise très lourde qui demande de larges compétences et de gros moyens matériels et humains.
- le constructeur propose des « pré-calibrages » et suggère au laboratoire de rajouter des données complémentaires avec les échantillons qu'il a l'habitude de traiter. Une telle approche ne peut être efficace que pour des composés dont l'analyse est facile, peu sensibles aux effets matrice. Le champ d'application restera forcément limité si on souhaite assurer la qualité des résultats.
- le constructeur installe des calibrages complets. Ce cas, évidemment le plus souhaitable, ne peut se concevoir qu'à certaines conditions :
 - le constructeur doit pouvoir apporter toutes les informations au laboratoire sur la façon dont les calibrations ont été réalisées, sur les matrices auxquelles elles s'appliquent, sur le domaine de mesure, etc...
 - il est évidemment préférable que ces calibrages soient réalisés par des approches interlaboratoires qui limitent le risque en terme de raccordement et d'effet matrice.
 - il est très souhaitable que ces calibrages aient fait l'objet de tests interlaboratoires selon les normes en vigueur dans ce domaine aux fins d'en définir les caractéristiques et de disposer, pour le laboratoire, des premiers éléments d'une démarche de validation.
 - enfin, le constructeur doit avoir conçu un appareil pouvant être standardisé c'est à dire qu'un calibrage donné, réalisé sur un appareil de ce type, pourra donner les mêmes résultats sur tous les appareils identiques. Il s'agit là d'un point particulièrement sensible qui ne semble pas avoir été à ce jour résolu par tous les constructeurs.

5 CQI

Les points précédents étant acquis, il faut être conscient que l'utilisation de l'IRTF entraîne, pour le laboratoire, une obligation de mise en place d'un outil de contrôle de la qualité des résultats qui doit faire appel à une stratégie spécifique et originale. La très puissante automatisation du système, alliée à la mise en œuvre simple de la machine, constituent en effet des pièges redoutables en terme de dérive des résultats ou d'existence d'aberrants non repérés. Seul un système très complet et strict de repérage des

matrices, d'élimination des résultats concernant des échantillons non conformes à des définitions précises, d'introduction dans les séries d'échantillons de contrôle suffisamment nombreux et la parfaite gestion des données recueillies peut permettre d'assurer la qualité des résultats. Tout laboratoire doit savoir que le temps passé au contrôle de la qualité des résultats prend, avec l'IRTF, une part beaucoup plus importante du temps total passé à l'analyse que celle qui doit être accordée aux autres méthodes habituellement mises en œuvre dans les laboratoires d'œnologie. Il est désormais acquis que les laboratoires, qui ont su mettre en œuvre les moyens nécessaires de ce contrôle, obtiennent avec l'IRTF, outre un confort de travail inégalé et une large optimisation des performances du laboratoire, une qualité globale d'analyse nettement supérieure à celle autorisée par toutes les méthodes automatiques utilisées à ce jour.

Enfin il est vivement recommandé aux laboratoires utilisant l'IRTF de conserver, pour chaque paramètre important, l'usage d'une méthode référente.

6 L'avenir

Même si un manque certain d'information a pu faire douter certains de l'intérêt de la méthode, sa large diffusion dans le monde entier suffit à en prouver les capacités. L'intérêt de la méthode repose bien sûr sur son extrême automatisation et l'absence d'utilisation de réactifs chimiques, mais aussi sur le fait qu'elle permet d'accéder non seulement à des informations analytiques classiques pour les composés organiques des moûts et des vins, mais aussi, à des informations plus larges. Nous avons ainsi déjà évoqué l'utilisation de la méthode chimiométrique exploratoire qui est peu appliquée pour l'instant en œnologie, mais qui peut permettre la caractérisation d'un vin ou d'un moût dans une catégorie donnée par analyse globale du spectre infrarouge. Une première application de cette approche est déjà opérationnelle. Elle consiste à vérifier avant analyse la matrice à laquelle on a à faire (vin sec, moût, vin doux naturel, etc..) afin de lui appliquer automatiquement le calibrage adéquat. L'application de la chimiométrie exploratoire ne s'arrête pas là et des recherches sont en cours dans plusieurs domaines.

Un autre grand sujet de développement est celui de l'analyse indiciaire. Il ne s'agit plus de rechercher la concentration d'un composé organique donné, mais de définir une valeur indiciaire pour un élément corrélé à un équilibre donné des composés organiques absorbant dans le moyen infrarouge. C'est l'approche qui est déjà appliquée pour l'acidité totale et le pH des moûts et des vins, et le potassium des moûts. En toute hypothèse, d'autres indices sont accessibles.

Il est possible d'aller encore plus loin et de retrouver, dans le spectre des moûts ou des vins, des données biologiques liées, par exemple, à l'intervention de microorganismes tels que le *Botrytis cinerea*, les levures ou les bactéries. Dans ce cas, l'approche devient plus complexe et nécessite l'utilisation d'outils mathématiques permettant d'analyser des corrélations non linéaires tels que les réseaux de neurones.

Ces développements en sont à leur début et devraient aboutir, à terme, à des outils capables d'apporter, avec des délais d'analyse très courts, outre une très complète information analytique de type classique, des informations sur l'origine, la nature et la qualité des raisins, des moûts et des vins.

CONCLUSION

Après cinq années d'application, l'IRTF est maintenant bien implantée en œnologie. Son image a manifestement souffert de mauvaises informations qui n'ont pas permis de bien comprendre le fonctionnement profond de cette technique qui est fort éloigné de celui des méthodes conventionnelles. En particulier, la mise en œuvre de l'IRTF dans un laboratoire d'œnologie demande un travail et des moyens importants

qui ont le plus souvent été mal évalués. Nous sommes loin de la technique "presse bouton" qui a pu parfois être revendiquée. De même, l'utilisation de l'IRTF suppose l'utilisation d'un système très puissant du contrôle de la qualité sans lequel les risques de dérives sont loin d'être négligeables. Ces éléments limitants ne doivent pas masquer les performances remarquables de cette méthode dont les développements potentiels sont encore nombreux. L'IRTF constitue par ailleurs une opportunité irremplaçable pour l'automatisation de l'analyse en œnologie. En effet, les techniques automatiques antérieures, issues de l'analyse médicale, ne sont plus actuellement développées et les fournisseurs se font rares. On constate, dans un même temps, que les techniques actuellement utilisées en analyses médicales ne sont pas transférables à l'œnologie contrairement à ce qui a pu exister par le passé. L'IRTF est par ailleurs largement appliquée dans d'autres domaines importants de l'agroalimentaire :

- discrimination et authentification des aliments et ingrédients alimentaires,
- industries céréalières,
- analyses des jus de la canne à sucre,
- contrôle de la qualité de l'alimentation animale,
- analyse des laits et des produits laitiers,
- analyse de la viande.

Il est grand temps que l'œnologie se familiarise davantage avec cette technique nouvelle très séduisante mais beaucoup plus délicate qu'il ne peut le paraître au premier abord. Elle

fait, en effet, appel à des concepts très différents de ceux qui nous ont été enseignés par la chimie traditionnelle et demande donc, pour l'utilisateur, une formation approfondie et un temps d'adaptation qui peut être important. Elle constitue cependant aujourd'hui, à l'évidence, une des plus importantes voies de développement envisageable pour nos laboratoires.

EN RÉSUMÉ ...

Depuis 5 ans, l'IRTF est utilisée dans les laboratoires d'œnologie. Cette technique, qui permet une automatisation très poussée et n'utilise aucun réactif chimique, fait appel à des concepts très nouveaux dans le domaine de la chimie analytique. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que sa prise en main, dans un laboratoire, puisse poser des problèmes de compréhension et d'adaptation. Leur analyse est décrite en détail de même que les solutions qui leur sont apportées. Ces difficultés ne doivent pas cacher l'opportunité remarquable que représente cette méthode.

