

Comparer trois méthodes d'évaluation pour déterminer la proportion de vert et de sec d'un échantillon d'herbe

Tri manuel, analyse d'images et spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR)

Laurent Lanore¹, Bruno Meunier², Michel Jestin¹, Donato Andueza¹, Pascal Carrère³
et Anne Farruggia¹

Résumé : Lors d'expérimentations s'intéressant à l'impact du pâturage sur l'évolution du couvert végétal, nous utilisons plusieurs indicateurs pour caractériser l'état de la végétation prairiale. La proportion de matériels vert et sec dans la biomasse aérienne d'une prairie constitue un indicateur intéressant, en lien avec la valeur nutritive de l'herbe disponible mais long à mettre en œuvre car généralement obtenu à partir d'échantillons d'herbe triés manuellement. Pour gagner en efficacité, nous avons testé deux autres méthodes qui pourraient se substituer au tri manuel : l'analyse d'images (AI) et la spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR). Nous avons comparé les trois méthodes sur 125 échantillons d'herbe obtenus sur des prairies variées du point de vue de leur végétation. Les deux méthodes originales présentent des avantages, notamment une plus grande répétabilité des conditions d'analyse des échantillons et surtout un considérable gain de temps. L'AI ne nécessite pas de traitement particulier de l'échantillon d'herbe qui, cependant, doit être numérisé peu de temps après son prélèvement, avant d'être flétri. La SPIR demande un peu plus de préparation (séchage et broyage de l'échantillon) mais le spectre d'absorption obtenu permettrait d'accéder à des données intéressantes pour le domaine de nos expérimentations sans passer par le tri ou le dosage chimique (proportion vert/sec, Matière Azotée Totale (MAT) ...).

Les régressions obtenues entre tri manuel et AI puis entre tri manuel et SPIR sont bonnes ($R^2 = 0,9387$ entre tri et AI et $R^2 = 0,9645$ entre tri et SPIR) et font envisager une substitution du tri manuel par ces méthodes.

Mots clés : herbe, tri manuel, analyse d'images, SPIR, vert, sec.

Introduction

Les prairies permanentes couvrent en France 9,9 millions d'ha (Agreste, 2009) soit 1/3 de la SAU (Surface Agricole Utile) et elles constituent la principale source d'alimentation des herbivores domestiques. La valorisation de l'herbe par le pâturage est à rechercher dans les exploitations d'élevage car elle diminue sensiblement le coût de l'alimentation des animaux en diminuant la part de concentrés (Prache S. *et al*, 2009). Le pâturage reste ainsi le mode d'exploitation de l'herbe le moins coûteux. Les qualités nutritionnelles de l'herbe pour l'animal dépendent de sa composition en éléments nutritifs et en parois. En situation de fort chargement, le couvert prairial offert aux animaux reste feuillu et homogène tout au long de la saison de pâturage. En revanche, lorsque le niveau de chargement diminue, la quantité d'herbe disponible devient supérieure aux besoins des animaux et la prairie est sous exploitée. Le couvert est alors hétérogène et la végétation est un mélange complexe d'herbe verte et

¹ UR1213 URH, Unité de recherche sur les herbivores – équipe RAPA, Relation animal, plante et aliments – INRA F-63122 Saint Genès-Champanelle ☎ 04 73 62 42 17 ✉ laurent.lanore@clermont.inra.fr

² UR1213 URH, Unité de recherche sur les herbivores – équipe DIMA, digestion microbienne et absorption- INRA

³ UR0874 UREP, Unité de recherche sur l'écosystème prairial – équipe FGEP, Fonction et gestion de l'écosystème prairial - INRA

sèche dont la proportion relative affecte l'appétibilité et la qualité de l'herbe offerte aux animaux (**Figure 1**).



Figure 1 © A. Farruggia/Inra: *Mélange complexe d'herbe verte et sèche dans la biomasse aérienne d'une prairie*

Lors d'expérimentations s'intéressant à l'impact du pâturage sur l'évolution du couvert végétal en situation de faible chargement, les scientifiques ont besoin d'indicateurs pour caractériser l'état de la végétation prairiale. Dans ce contexte, la qualité de l'herbe d'une prairie peut être appréciée grâce à des indicateurs de l'état du couvert végétal issus d'analyses chimiques de l'herbe tels que la teneur en matières azotées totales (MAT), en glucides, en parois... Ces indicateurs fréquemment utilisés, sont précis, mais nécessitent d'avoir recours à des analyses souvent coûteuses. De plus, dans les prairies pâturées dites « extensives » présentant une grande hétérogénéité structurale, il faut multiplier le nombre d'échantillons pour bien caractériser la végétation offerte. La recherche d'indicateurs plus globaux et directs d'accès est donc un enjeu fort. Un indicateur comme la proportion d'herbe verte et d'herbe sèche donne une idée globale de l'état d'un couvert végétal. La technique généralement utilisée dans les recherches sur l'interaction herbe/animal pour déterminer cette proportion consiste en un tri manuel brin par brin d'échantillons représentatifs de la prairie. Cette méthode est cependant longue et fastidieuse, et seuls deux à trois échantillons de 30g peuvent être triés par demi journée et par personne. Nous avons dès lors imaginé et testé deux alternatives moins contraignantes en temps de travail, pouvant se substituer au tri manuel : (i) l'utilisation de la spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR) et (ii) le recours à la photographie associée à la technique d'analyse d'images (AI). L'AI a déjà été utilisée pour étudier la morphologie des racines de graminées prairiales, notamment pour la mesure du diamètre de ces racines (Revaillot S. et Picon-Cochard C., 2005). La SPIR, quant à elle, trouve des applications par exemple, dans détermination de la valeur alimentaire de fourrages ou l'étude de leur digestibilité à partir de fèces (Laboratoire d'alimentation animale du Cirad, 2007).

Nous avons mis en place une expérimentation qui visait à comparer les trois techniques sur les mêmes échantillons d'herbe, en nous appuyant sur trois dispositifs expérimentaux existant dans notre équipe.

1. Sites de test des méthodes et modalités de prélèvement des échantillons

Les sites ont été choisis afin d'avoir une large palette de couverts végétaux en terme de composition floristique et d'intensité d'utilisation. Plusieurs dates de prélèvement ont été retenues afin de couvrir une grande gamme de proportion de vert avec des couverts à différents stades phénologiques (mai, juin et début juillet ; mi-novembre).

Nous avons ainsi prélevé au total 125 échantillons d'herbe sur les trois sites suivants :

- le site Inra de la ferme expérimentale de Marcenat (Unité expérimentale des Monts d'Auvergne, Cantal), les 27 juillet et 15 novembre 2006, sur des prairies permanentes de moyenne montagne très diversifiées (92 espèces végétales sur 3,6 ha), situées à 1 200 m d'altitude. Ces prairies étaient pâturées par des génisses charolaises à trois niveaux de chargement (0,8 ; 1,4 et 1,9 UGB/ha soit 3, 5 et 7 animaux). Les 60 échantillons prélevés (30 à chaque période) ont été classés en deux catégories selon la hauteur de l'herbe sur pied appréciée visuellement : Haut (>8cm) et Bas (<8cm) ; Ils ont été coupés avec des ciseaux à 2-3cm du sol, ce qui correspond au seuil minimum au-delà duquel une génisse ne peut pâturer.
- la station expérimentale des Haras nationaux de Chamberet (Corrèze) les 26 juin et 15 novembre 2006, sur des prairies temporaires de 2,7 ha, de plus de 5 ans, situées à 565 m d'altitude, moyennement diversifiées (56 espèces sur 2,7 ha). Ces prairies étaient pâturées par des chevaux de selle à deux niveaux de chargement (1,1 et 1,85 équivalents UGB/ha soit 3 et 5 animaux). Les 54 échantillons (24 à la première date et 30 à la seconde) ont été classés en quatre catégories en fonction de la hauteur sur pied et du stade végétatif par appréciation visuelle : Epié, Haut végétatif (>10cm), Intermédiaire végétatif (entre 5 et 10 cm) et Ras végétatif (<5cm). Ils ont été coupés à l'aide de ciseaux le plus près possible du sol car les chevaux ont un seuil de préhension de l'herbe beaucoup plus bas que les génisses grâce à leur double rangée d'incisives.
- le site Inra de l'Observatoire de recherche en environnement (ORE) de Theix (Puy de Dôme) le 16 mai 2007 sur des prairies permanentes moyennement diversifiées (en moyenne 22,6 espèces par parcelle de 2 200 m²), situées à 880 m d'altitude et soumises à quatre modes d'exploitation : pâturage par des génisses Prim'Holstein à deux niveaux de chargement (1,3 et 0,65 UGB/ha) ou par des brebis à un seul niveau de chargement (0,65 UGB/ha), fauche et abandon (parcelles non pâturées et non fauchées). Les 80 sous-échantillons ont été prélevés au pic de biomasse à la micro tondeuse sur des bandes de 200x10cm dans des zones mises en défend pour les parcelles pâturées et dans des zones prédéfinies pour les parcelles de fauche ou d'abandon.

Tableau 1 : Caractéristiques des sites et nombre de prélèvements par site

Sites	Marcenat	Chamberet	ORE
Mode d'exploitation	Pâturage bovin (génisses charolaises)	Pâturage équin (chevaux de selle)	Pâturage bovin et ovin, fauche et abandon
Niveaux deChargement	Faible = 0,8 UGB/ha Moyen = 1,4 UGB/ha Fort = 1,94 UGB/ha	Faible = 1,1 éq. UGB/ha Fort = 1,85 éq. UGB/ha	Faible = 0,65 UGB/ha Fort = 1,3 UGB/ha
Périodes de prélèvement	Fin juillet et mi-novembre	Fin juin et mi-novembre	Mi-mai
Echantillons prélevés	10 par période et par niveau de chargement	- Fin juin : 20 au charg. faible et 4. au charg. fort - Mi novembre : 15 au charg. faible et 15 au charg. fort	- 48 en pâturage - 24 en fauche - 8 en abandon

Sur chaque site, au moment de la récolte, les échantillons ont été placés dans des sachets plastiques individuels puis ont été identifiés par un code reprenant la classification en fonction de la hauteur et du stade végétatif. Les sachets ont été fermés sous vide. Au laboratoire, ils ont été stockés en chambre froide à +4°C en attendant l'acquisition des images dans les jours suivants.

2. Détermination de la proportion de vert et de sec des échantillons par les trois méthodes

Les échantillons ont été soumis aux trois méthodes dans un ordre respectant les traitements à effectuer : AI, tri manuel et SPIR. Des tests préalables avaient en effet montré que l'acquisition de l'image de l'échantillon pour l'AI devait être effectuée sur l'herbe fraîche ou stockée quelques jours à 4°C (4 jours au maximum), l'analyse de l'image elle-même pouvant être faite ultérieurement. Le tri manuel pouvait quant à lui, être réalisé sur un échantillon conservé à -20°C tandis que le passage à la SPIR se faisait après séchage et broyage.

Pour les trois méthodes employées, il a été considéré que l'herbe sèche regroupait à la fois de l'herbe sénescente (plus de 50 % de tissus jaunes) et de l'herbe morte (100 % de tissus sans chlorophylle).

2.1. Photographie des échantillons associée à l'analyse des images

2.1.a Principe de l'analyse d'images

L'AI est basée sur la mesure de surfaces à partir d'une photographie en discriminant les différents éléments de l'image sur un critère colorimétrique. Des seuils de couleur doivent être fixés préalablement afin que les différents éléments de l'échantillon soient classés en fonction de leur couleur.

2.1.b. Mise au point de la méthode

La première étape de notre travail a consisté à choisir le matériel que l'on utiliserait pour photographier et numériser les échantillons. Après une tentative de prise de photographies avec un appareil numérique et une luminosité contrôlée en laboratoire, nous avons opté pour un scanner A4 à plat (Epson Perfection 3590) que nous avons muni d'un bac noir sans fond et d'un couvercle lesté (**Figure 2**). Grâce à ce scanner adapté, l'herbe était bien plaquée contre la vitre et nous avons plus facilement des conditions de luminosités toujours similaires, ce que nous avons contrôlé grâce à une charte de couleur Greta MacBeth. Nous avons ainsi acquis des images de grande qualité (15 M pixels à une résolution spatiale de 400 dpi) avec une distinction nette des herbes les plus fines. Les images ont été enregistrées sans compression dans le format TIFF-RGB. Nous avons utilisé un fond bleu sur le couvercle pour bien différencier les couleurs vertes et jaunes de l'herbe de ce qui n'appartenait pas à l'échantillon (fond du couvercle, terre). Nous avons programmé en Visual Basic sous le logiciel Visilog 6 (© Noesis, France) une application pour traiter automatiquement les images sur la base des seuils de couleur. Nous avons paramétré ces seuils afin de déterminer la surface de l'image couverte par du vert (matériel vivant), par du jaune (matériel sec) et par du bleu (fond du couvercle).

Enfin, nous avons réalisé des tests préliminaires afin de déterminer le poids optimal de l'échantillon pour obtenir une image représentative et de qualité. Nous avons conclu que le

poids de l'échantillon ne devait pas excéder 30 g et que la longueur des brins ne devait pas dépasser 5 cm afin qu'il y ait le moins de chevauchements possibles entre les brins d'herbe.



Figure 2 : *Scanner avec bac noir et couvercle lesté bleu.*

2.1.c Traitement des échantillons et obtention des données

Chaque échantillon a été étalé minutieusement sur la vitre A4 du scanner pour éviter au maximum le chevauchement des brins. Il a été numérisé trois fois avec un brassage entre chaque numérisation. Une fois les trois numérisations terminées, chaque échantillon était récupéré dans sa totalité puis stocké à -20°C dans l'attente d'être trié manuellement. Les images acquises ont été traitées directement par le logiciel Visilog, pour obtenir une image sur l'écran de l'ordinateur de chaque échantillon séparé en quatre sous-images : les trois fractions retenues (vert, jaune et bleu) et la photo de l'échantillon complet (**Figure 3**). Un tableau nous donnait également directement la part de surface occupée par les trois couleurs, le pourcentage de vert et de sec étant obtenu par un simple calcul.

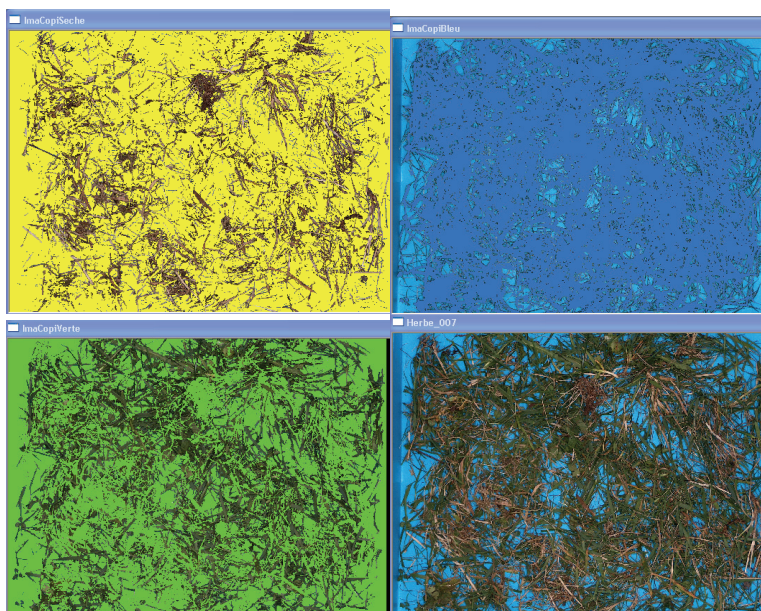


Figure 3 : *Résultat du « tri » effectué par le logiciel Visilog pour un échantillon. De gauche à droite et de haut en bas : jaune= fraction de sec, fond bleu, fraction de vert et image originale de l'échantillon total.*

2.2 Tri manuel

Les échantillons stockés à - 20°C, ont été décongelés et triés. La méthode dite de « tri vert/sec » consiste à séparer le matériel vivant du matériel sec. En coupant les brins d'herbe présentant à la fois du vert et du sec, on arrive à séparer assez finement les deux types de compartiments. Les deux fractions ainsi obtenues ont été placées séparément dans des barquettes préalablement tarées et ont été pesées pour calculer le taux de matière sèche. Celles-ci ont ensuite été placées 72 h à 60°C. Après le séchage des 125 échantillons, la pesée des deux fractions a permis de calculer la proportion de vert et de sec.

Cette méthode fiable, sur laquelle nous avons quarante ans de recul sur les résultats acquis, a été prise comme référence pour étalonner les deux autres techniques.

2.3. Spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR)

2.3.a Principe de la SPIR

L'analyse par la spectroscopie dans le proche infrarouge repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge par la matière organique (MO). Cette absorption est directement liée au nombre et au type de liaisons des constituants de la MO (O-H, N-H, C-H, etc.). La SPIR est une méthode de mesure comportant deux phases, une phase de calibration et une de validation. Lors de la première, on saisit le spectre d'absorption d'une gamme d'échantillons pour lesquels les analyses chimiques ou les tris classiques ont été réalisés afin de pouvoir établir une correspondance entre les spectres et les valeurs de référence. On obtient ainsi une équation de prévision. Lors de la deuxième phase, on applique cette équation à d'autres échantillons afin de vérifier la validité du model obtenu.

2.3.b Traitement des échantillons

Les deux fractions séchées de chaque échantillon ont été regroupées, homogénéisées, broyées en particules de 0,8 mm puis placées dans des cellules de mesure. Après le passage dans le spectromètre, un spectre d'absorption dans le proche infrarouge a été obtenu pour chaque échantillon.

2.3.c Calibration de l'équation « vert-sec » et obtention des données

Les 2/3 des échantillons pris au hasard (n = 83) ont servi à réaliser une équation de prévision de la proportion de vert en s'appuyant sur les résultats du tri manuel. Il nous restait donc 1/3 des échantillons (n = 42) pour tester la relation entre le tri manuel et la SPIR.

3. Résultats

3.1 Étapes de l'analyse

Dans un premier temps, nous avons regardé la distribution du pourcentage de vert obtenu avec le tri manuel à l'aide d'histogrammes et vérifié que nous avions une gamme assez large de proportions de vert pour pouvoir utiliser les équations de prédiction. Ensuite, nous avons réalisé une procédure d'analyse descriptive avec le logiciel SAS-Stat (SAS Institute Inc.) qui nous a donné les corrélations, par le calcul du coefficient de Pearson, entre le pourcentage de vert obtenu par le tri manuel et par l'AI puis entre le pourcentage de vert obtenu par le tri manuel et par la SPIR. Enfin, nous avons réalisé des droites de régression pour obtenir les

équations de passage d'une méthode à l'autre et pour calculer le coefficient de détermination (R^2). Nous avons également calculé l'erreur type de prévision.

3.2 Gamme de pourcentage de vert obtenu avec le tri manuel

Nous avons obtenu par tri manuel une gamme de proportion de vert s'étalant de 8 à 98 % avec un grand nombre d'échantillons entre 40 et 60 % puis entre 90 et 98 % (**Figure 4**).

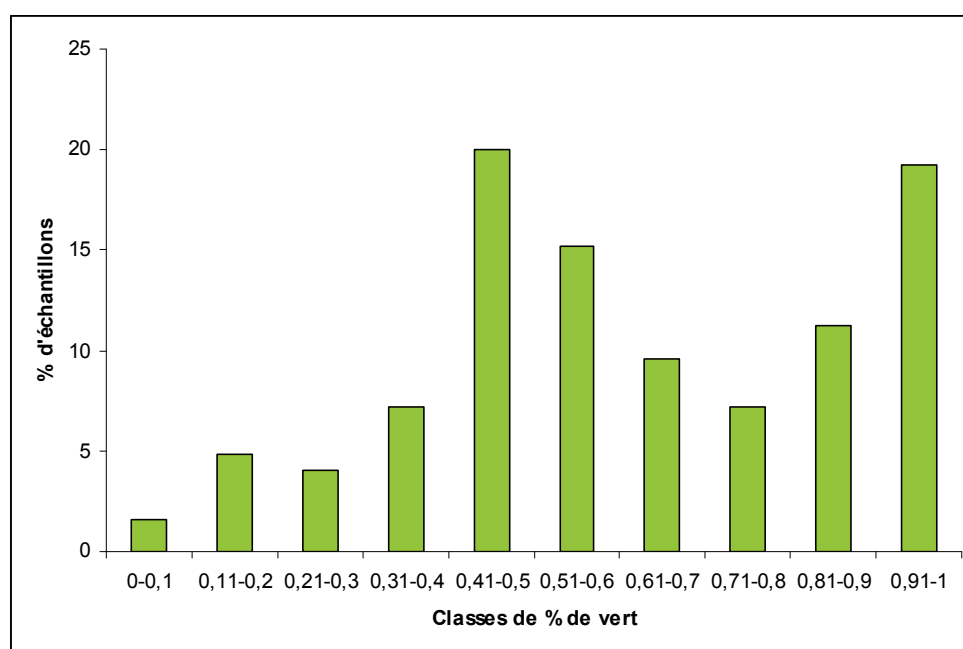


Figure 4 : distribution du pourcentage de vert par le tri manuel ($N_{Tri\ manuel} = 125$)

3.3 Comparaison du pourcentage de vert mesuré par AI et par SPIR avec le pourcentage de vert obtenu par tri manuel

Sur les trois sites et à toutes les dates, exceptées pour une date à Chamberet, le pourcentage d'herbe verte obtenu par analyse d'images est toujours supérieur à celui obtenu à partir du tri manuel. La corrélation entre le pourcentage de vert obtenu par l'AI et celui obtenu par tri manuel est de 0,97 ($p < 0.0001$) et celle entre le pourcentage de vert obtenu par SPIR et celui obtenu par tri manuel est de 0,98 ($p < 0.0001$).

La relation entre le tri manuel et l'analyse d'images (**Figure 5a**) est satisfaisante (avec un $R^2 = 0,9387$ et une erreur type = 0,06) et donne l'équation de passage suivante :

$$\% \text{ vert AI} = 1,0121 \% \text{ vert Tri.}$$

La relation entre le tri manuel et la spectroscopie proche infrarouge (**Figure 5b**) est également satisfaisante (avec une $R^2 = 0,9645$ et une erreur type = 0,05) avec l'équation de passage suivante :

$$\% \text{ vert SPIR} = 0,9826 \% \text{ vert Tri.}$$

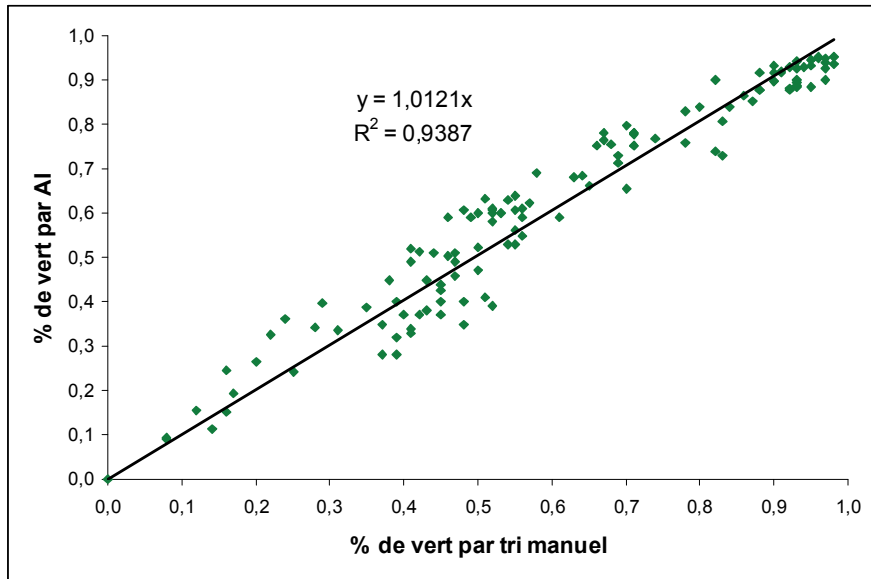


Figure 5a : comparaison du % de vert entre tri manuel et AI.

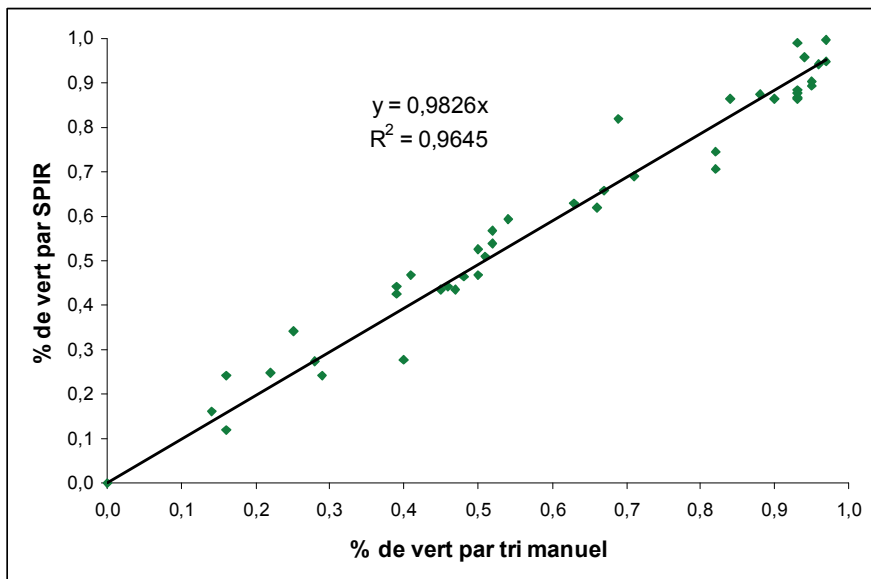


Figure 5b : comparaison du % de vert entre tri manuel et SPIR.

5. Discussion

Les résultats obtenus sont généralisables à des prairies aux profils très divers car notre échantillonnage d'herbe couvrait une large gamme de pourcentages de vert ainsi que de types de couverts prairiaux et de modes d'exploitation, allant de la prairie très diversifiée pâturée à faible chargement à l'ancienne prairie temporaire pâturée à fort chargement en passant par les prairies fauchées ou abandonnées.

La différence constante de pourcentage de vert observée entre celui obtenu par l'analyse d'images et celui obtenu par tri manuel (AI > tri) s'explique probablement par le fait que l'AI mesure des surfaces et le tri mesure un poids.

L'absence de différence entre la SPIR et le tri manuel est due au fait que les résultats donnés par la SPIR font suite à une phase de calibration pour laquelle les spectres d'absorption des deux tiers des échantillons ont été associés à des proportions de vert provenant du tri manuel. Les résultats satisfaisants de la corrélation entre le pourcentage de vert obtenu par l'AI et la SPIR et celui obtenu par le tri manuel permettent d'appliquer les équations de passage proposées à une gamme large de couverts prairiaux pour en estimer le pourcentage d'herbe verte.

Chaque méthode a néanmoins ses avantages et ses limites qu'il convient de bien cerner. Le tri manuel est la méthode la plus utilisée car la plus simple à mettre en œuvre. Elle ne nécessite aucun matériel spécifique pour la phase de tri proprement dite. En revanche, il faut disposer d'une étuve à température réglable pour sécher les échantillons après le tri et d'une balance de précision pour déterminer la proportion de chacune des deux fractions (vert et sec). Certes la technique est simple mais elle est longue et fastidieuse et donc peu adaptée pour de grandes séries d'échantillons. Un grand décalage dans le temps est possible entre le prélèvement et le tri grâce à la congélation des échantillons.

Avec l'analyse d'images, nous avons obtenu les proportions de vert des échantillons d'herbe avec une bonne précision et une bonne répétitivité. De plus, cette méthode est rapide et facile à mettre en œuvre ; elle ne demande pas de manipulation des échantillons telles que le tri, le séchage ou le broyage mis à part la coupe en brins d'environ 5 cm. C'est une technique qui nécessite peu d'investissement : un scanner muni d'un bac noir à fond bleu et le logiciel d'analyse d'images Visilog. C'est une méthode non destructive qui laisse l'échantillon frais intact pour d'autres traitements. De plus, l'analyse proprement dite des images des échantillons peut être décalée dans le temps par rapport à la numérisation. Par ailleurs, elle ne dépend pas d'un facteur humain pour la discrimination entre vert et sec. C'est une méthode qui permet une séparation plus fine et non dépendante des conditions variables que l'on peut retrouver lors du tri manuel comme l'éclairage, le support ou le trieur. En revanche, elle nécessite un matériel à proximité du lieu de prélèvement car l'acquisition des images ne peut pas être faite sur des échantillons congelés et le stockage en chambre froide à + 4°C ne peut pas dépasser 4 jours.

La SPIR a également donné une bonne estimation du pourcentage de vert de nos échantillons. C'est une méthode précise et assez rapide mais de mise en œuvre plus longue et plus complexe que l'analyse d'images. Elle nécessite non seulement le séchage (étuve à température réglable) et le broyage des échantillons (broyeur avec grille de 0.8mm) ainsi que le remplissage des cellules de mesure mais aussi une longue phase de calibration. Cependant, la SPIR permet de saisir en peu de temps un grand nombre d'échantillons et d'effectuer un nombre conséquent d'analyses sur le même échantillon. Les Spectromètres proche infrarouge de bonne qualité disponibles sur le marché sont onéreux ce qui constitue un frein pour l'investissement dans cette technique (en contrôle qualité dans les industries agro-alimentaires par exemple, le grand nombre d'échantillons analysés rentabilise rapidement l'équipement face au coût élevé et à la longueur des analyses chimiques). De même que pour le tri manuel, il peut y avoir un grand décalage entre le prélèvement et la saisie des spectres car les échantillons peuvent être congelés avant d'être séchés et broyés.

Conclusion

Notre objectif était de tester les performances relatives de techniques originales plus rapides et plus précises que le tri manuel pour déterminer la proportion de matériel vert et sec d'échantillons d'herbe. Les résultats obtenus par analyse d'images et par SPIR, nous permettent de valider l'utilisation de ces deux méthodes pour mesurer cette proportion. De plus, les deux méthodes présentent des spécificités qui laissent entrevoir des perspectives pour soulager davantage la charge que représente le tri manuel notamment pour les tris par familles (graminées, légumineuses et diverses) ou pour les tris par organe (feuille, tige, épi, fleur...).

Remerciements : *Les auteurs remercient Jean-Pierre Chaise pour la conception et la réalisation des adaptations mécaniques apportées au scanner ainsi que Jean-Marie Ballet pour sa contribution au prélèvement et au tri manuel des échantillons.*

Bibliographie

AGRESTE (2009) La statistique, l'évaluation et la prospective agricole

CIRAD, Laboratoire d'alimentation animale (2007) La spectroscopie dans le proche infrarouge

Prache S. *et al.* (2009) Maximiser la part du pâturage dans l'alimentation des ovins : intérêt pour l'autonomie alimentaire, l'environnement et la qualité des produits, Fourrages (199) p 349-371

Revaillet S. et Picon-Cochard C. (2005) Méthode de numérisation et d'analyse d'images de racines de graminées prairiales. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, N°55, p.33-44