

Perspectives offertes par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge dans l'étude de systèmes racinaires de légumineuses

Eylenbosch D.¹, Baeten V.², Bodson B.¹, Fernández Pierna J.A.²

¹ TERRA, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Gembloux, Belgique.

² Unité Qualité des produits, Département Valorisation des productions, Centre wallon de Recherches agronomiques, Gembloux, Belgique.

Correspondance: j.fernandez@cra.wallonie.be

Résumé

Cet article synthétise les résultats de plusieurs études menées sur des systèmes racinaires de pois protéagineux en utilisant les données fournies par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge, une technique d'analyse combinant l'imagerie et la spectroscopie vibrationnelle. Dans un premier cas d'étude, cette méthode d'analyse a permis de quantifier la masse de racines de pois protéagineux au sein d'échantillons de racines prélevés sous des cultures en association de pois protéagineux et de froment d'hiver. Dans un second cas d'étude, cette méthode d'analyse a permis de quantifier la leghémoglobine au sein de nodosités individuelles de pois. La concentration de cette molécule est liée à l'activité de fixation d'azote des nodosités et sert dès lors d'indicateur pour mesurer cette activité. Sur base des résultats de ces études, cet article propose aussi des pistes de réflexion et de développement en lien avec l'imagerie hyperspectrale dans l'étude des systèmes racinaires de légumineuses. Il vise également à démontrer dans quelle mesure cette technique d'analyse constitue un outil de mesure intéressant dans l'étude des systèmes racinaires en général.

Mots-clés : Racines, Pois, Nodosités, Leghémoglobine, Discrimination, Quantification

Abstract: Perspectives offered by near-infrared hyperspectral imaging in the study of legume root systems

This paper summarizes the results of several studies conducted on pea root systems using data provided by near infrared hyperspectral imaging, an analytical technique combining imaging and vibrational spectroscopy. In a first case study, this analytical method was used to quantify the mass of pea roots in root samples collected under pea-wheat intercropping. In a second case study, this analytical method was used to quantify leghaemoglobin in individual pea nodules. The concentration of this molecule is related to the nitrogen fixation activity of nodules and is therefore used as indicator to measure this activity. On the basis of the results of these studies, this article proposes ways of reflection and development related to hyperspectral imaging in the study of legume root systems and aims demonstrating to what extent this analytical technique constitutes an interesting measurement tool in the study of other root systems.

Keywords: Roots, Peas, Nodules, Leghaemoglobin, Discrimination, Quantification

Introduction

Les légumineuses ont la formidable capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries spécifiques. Cette propriété des légumineuses confère un intérêt agronomique majeur à ces cultures qui sont utilisées dans la rotation ou en association pour apporter de l'azote dans les sols.

Cette fixation d'azote atmosphérique a lieu au niveau des racines des légumineuses, dans des structures racinaires appelées nodosités, abritant les bactéries responsables de cette fixation (*Rhizobium*). L'étude du développement racinaire et des nodosités des légumineuses est dès lors important pour caractériser la dynamique de fixation de l'azote atmosphérique et les relations entre plantes notamment lorsque des légumineuses sont cultivées en association avec une ou plusieurs graminées. Les racines étant enfouies dans le sol, leur caractérisation demande cependant un long travail d'extraction, de lavage et de tri. En effet, lorsque les racines sont prélevées en conditions réelles de culture, elles sont associées à d'autres éléments présents dans le sol tels que des résidus des cultures précédentes. Dans le cas des cultures associées, les racines des différentes espèces cultivées sont mélangées et leur caractérisation peut s'avérer difficile si elles sont morphologiquement semblables. L'étude de systèmes racinaires en conditions réelles de culture est donc une activité fastidieuse. Elle est donc rarement menée dans ces conditions et les systèmes racinaires sont plus généralement étudiés dans des dispositifs expérimentaux simplifiés.

Afin de lever les freins dans l'étude de systèmes racinaires dus à la présence d'autres éléments que des racines au sein d'échantillons de sol prélevés en conditions réelles de culture et aux similitudes entre racines de différentes espèces, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a été proposée comme nouvel outil analytique (Eylenbosch, 2018). Cette technique d'analyse est la combinaison de l'imagerie et de la spectroscopie vibrationnelle (Dale et al., 2013 ; Fernández Pierna et al., 2004). L'imagerie donne une information spatiale à propos d'un échantillon alors que la spectroscopie vibrationnelle fournit une information physico-chimique nécessaire pour la caractérisation de l'échantillon (Schwanninger et al., 2011). Cette combinaison permet de connaître la répartition spatiale de la composition physico-chimique d'un échantillon. Les systèmes d'imagerie hyperspectrale permettent l'acquisition d'un spectre proche infrarouge attribué à chaque pixel d'une image. L'analyse de l'allure du profil d'un spectre, par des modèles établis sur des spectres de référence, permet ensuite de prédire la nature physico-chimique de l'élément duquel le spectre a été acquis. Cette analyse des images hyperspectrales est réalisée avec les outils statistiques, mathématiques et informatiques fournis par la chimiométrie, la science qui permet d'extraire des informations pertinentes de données acquises par des analyses physico-chimiques (dans le cas présent par spectroscopie vibrationnelle) (Dale et al., 2012 ; Fernández Pierna et al., 2012). En assignant une couleur à chaque groupement de spectres correspondant à une classe d'éléments composants l'échantillon, il est ensuite possible de produire une image illustrant la distribution de ces différents composants au sein de l'échantillon (Figure 1). La construction de cette nouvelle image se fait pixel par pixel, chaque pixel ayant la couleur de la classe à laquelle il a été assigné suite à l'analyse de l'allure de son spectre proche infrarouge.

Dans le cadre des études sur les systèmes racinaires que nous avons menées, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a été utilisée en premier lieu pour discriminer des racines et des résidus de cultures extraits de carottes de sol (Eylenbosch et al., 2017). Il a ensuite été mis en évidence qu'il existait une relation linéaire entre la masse de racines présentes au sein d'un échantillon et le nombre de pixels de racines détectés sur l'image hyperspectrale de cet échantillon (Eylenbosch et al., 2018a), ce nombre de pixels étant une représentation de la projection orthogonale de la surface visible des racines sur le support d'acquisition. Cette relation permet dès lors de prédire la masse de racines présentes au sein d'un échantillon sur base du nombre de pixels classés comme étant des racines sur l'image hyperspectrale acquise sur cet échantillon. La précision de la prédiction dépend néanmoins de la manière dont l'échantillon est disposé lors de l'acquisition de l'image hyperspectrale (le recouvrement des éléments mène à une perte d'information et donc à une sous-estimation de la masse de racines de l'échantillon), du diamètre des racines (la relation a été établie pour des racines dont la largeur était de l'ordre de grandeur des pixels (0,3 mm)), de la qualité des modèles permettant de discriminer les racines et les autres éléments présents au sein des échantillons de sol ainsi que de la qualité des images acquises (Eylenbosch, 2018). La prédiction de la masse racinaire présente au sein d'échantillons est donc d'autant meilleure lorsque les éléments composant les échantillons sont bien

séparés lors de l'acquisition des images hyperspectrales, lorsque les racines sont fines (de l'ordre de grandeur de quelques pixels de large) et présentent peu de variation de diamètre, lorsque la diversité des spectres proche infrarouge utilisés pour construire les modèles de classification est élevée et lorsque le système d'acquisition des images hyperspectrales permet de répéter les mesures d'absorbance. Un suivi des données acquises par le système d'imagerie utilisé dans nos études nous a en effet montré qu'une variabilité de l'absorbance enregistrée pour un même échantillon acquis à différents moments pouvait être observée (Eylenbosch, 2018).

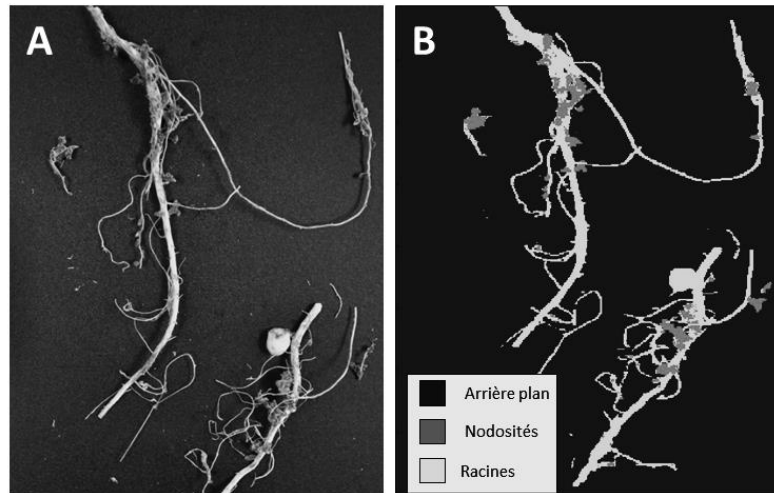


Figure 1 : (A) Photographie d'un échantillon de racines de pois protéagineux. (B) Image présentant la composition de cet échantillon. Cette image a été construite sur base des résultats de l'analyse de cet échantillon par imagerie hyperspectrale proche infrarouge et par des modèles de classification permettant de regrouper, au sein de trois classes prédéfinies (l'arrière-plan, les racines de pois et les nodosités), les spectres proche infrarouge acquis. L'analyse a été réalisée pour chaque pixel de l'image et une couleur a été assignée à chacune de ces trois classes.

Les potentialités de l'imagerie hyperspectrale dans la discrimination des éléments composant un échantillon et la relation linéaire permettant l'estimation d'une masse racinaire sur une image hyperspectrale ont été utilisées pour quantifier les masses racinaires de cultures de froment et de pois protéagineux d'hiver cultivées en association (Eylenbosch et al., 2018a). Les racines de ces deux cultures ont en effet des signatures spectrales distinctes qui permettent de les discriminer (Figure 2) et donc d'estimer la masse de racines de chacune des espèces du mélange sans devoir trier manuellement et peser les racines séparément. Cette étude fait l'objet du premier cas d'étude présenté dans cet article.

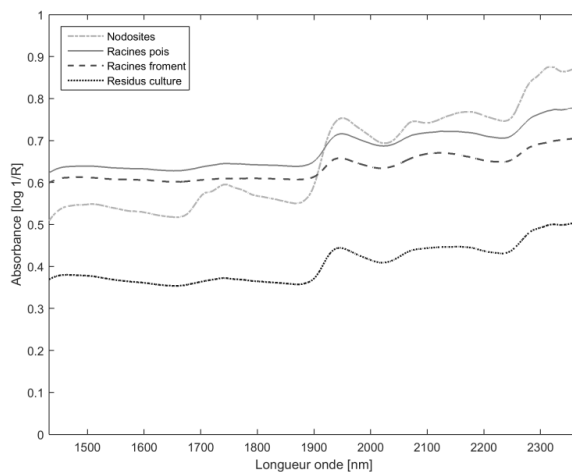


Figure 2 : Allures moyennes de spectres proche infrarouge acquis sur des échantillons contenant uniquement des nodosités, des racines de pois protéagineux, des racines de froment d'hiver ou des résidus de cultures. Les allures moyennes des spectres diffèrent selon la nature des échantillons sur lesquels ils ont été acquis. Figure extraite de Eylenbosch (2018).

Dans le cadre de recherches sur les systèmes racinaires des légumineuses, la teneur en leghémoglobine au sein des nodosités peut être mesurée pour estimer l'activité de fixation d'azote. Cette protéine, synthétisée dans le cytoplasme des cellules de la zone de fixation d'azote des nodosités (Pourmoayyed, 2016 ; Taiz et Zeiger, 2002), est en effet un indicateur de l'activité fixatrice d'azote des nodosités. Le rôle de cette protéine est de préserver de l'oxydation la nitrogénase qui est l'enzyme responsable de la transformation de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3), une forme d'azote assimilable par la plante (Downie, 2005). La leghémoglobine a une forte affinité avec l'oxygène et maintient la concentration en O_2 dans une gamme permettant de protéger la nitrogénase tout en maintenant la respiration des bactéries (Appleby, 1984 ; Wittenberg et al., 1974). La concentration en leghémoglobine des nodosités est fortement corrélée à la quantité d'azote fixée au sein des nodosités (Jun et al., 1994 ; Wilson et Reisenauer, 1963); une faible concentration en leghémoglobine au sein des nodosités mène à une faible fixation d'azote due à la haute teneur en O_2 et à l'inhibition de l'activité de la nitrogénase (Pourmoayyed, 2016). Cette molécule confère aux nodosités une couleur rosée qui permet de définir le stade de vie des nodosités. Lors de la mise en place des nodosités, suite à l'infection des racines de légumineuses par les bactéries, la leghémoglobine est absente. Les nodosités sont petites et blanches. Les nodosités prennent ensuite une couleur rose durant une phase de croissance rapide et d'activité intense de fixation de N_2 . Cette période d'activité des nodosités est d'environ cinq semaines. Les nodosités entrent ensuite en sénescence, leur activité de fixation cesse et elles prennent une couleur verte (Voisin et Gastal, 2015 ; Becana et al., 1995).

Une mesure quantitative de la concentration en leghémoglobine peut être réalisée sur des nodosités fraîches pour estimer l'activité fixatrice d'azote. Une méthode souvent utilisée consiste à séparer les nodosités des racines, à en extraire la leghémoglobine et à mesurer la concentration en leghémoglobine de la solution d'extraction par spectrophotométrie en utilisant l'hémoglobine humaine comme référence (Wilson et Reisenauer, 1963). Cette méthode comporte de nombreuses étapes qui peuvent mener à des erreurs de manipulation et qui prennent beaucoup de temps (Nkrumah et al., 2011). De plus, cette méthode de quantification nécessite l'emploi de cyanure, un réactif toxique (Srivastava et al., 2014). Enfin, cette méthode demande l'emploi de plusieurs nodosités pour effectuer la mesure et ne donne donc qu'une estimation moyenne de la teneur en leghémoglobine des nodosités prélevées sur une ou plusieurs plantes. Afin de faciliter la mesure des concentrations en leghémoglobine au sein de nodosités, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a été utilisée sur des nodosités sèches de pois protéagineux et a permis de mesurer la teneur en leghémoglobine au sein de nodosités individuelles (Eylenbosch et al., 2018b). Cette utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge fait l'objet du second cas d'étude présenté dans cet article.

1. Cas 1: Quantification de racines de pois protéagineux et de froment d'hiver cultivés en association.

La culture en association de légumineuses et de céréales a plusieurs intérêts: augmentation et stabilisation des rendements et des marges brutes des cultures associées par rapport aux cultures pures, réduction de la pression des adventices, teneur en protéines plus élevée chez les céréales, meilleure valorisation des ressources abiotiques (lumière, azote du sol et atmosphérique) (Carton, 2017 ; Pierreux et al., 2016 ; Bedoussac et al., 2015). Les avantages en termes de fourniture d'azote à la culture céréalière interviennent au niveau des racines des cultures associées (Thilakarathna et al., 2016 ; Fujita et al., 1992). De manière à caractériser la biomasse racinaire de cultures en association et de la comparer à celles de cultures pures, le prélèvement de racines et la séparation des racines des légumineuses et des céréales est nécessaire. Cependant, la séparation des racines des différentes espèces sur base de critères morphologiques est difficile, d'autant plus lorsque les racines sont fragmentées lors du prélèvement et du lavage des échantillons et lorsqu'elles sont séchées. Pour pouvoir quantifier les racines de cultures de pois protéagineux et de froment d'hiver cultivées en

association sans devoir les séparer ni les peser, une méthode de discrimination et de quantification basée sur l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a été mise au point (Eylenbosch et al., 2018a).

1.1 Matériels et méthodes

Les échantillons de racines ont été prélevés en conditions réelles de culture par carottage de sol (carottes de 3 cm de diamètre sur 30 cm de profondeur). Ces carottes de sol ont ensuite été lavées à l'eau afin d'extraire les racines du sol. D'autres éléments tels que des résidus des cultures précédentes et de petits cailloux étaient également extraits lors du lavage des échantillons. Afin d'assurer une conservation sur le long terme, ces racines et les éléments qui leur étaient associés ont ensuite été séchés à 60°C jusqu'à atteindre un poids constant. Ce séchage permet également d'obtenir des informations de meilleure qualité lors de l'analyse des images hyperspectrales car l'eau libre possède une forte signature spectrale aux alentours de 1400 et 1900 nm qui est donc susceptible de masquer d'autres informations au sein des spectres. Les échantillons séchés ont ensuite été étalés sur une bande transporteuse passant sous une caméra hyperspectrale (système d'acquisition développé par BurgerMetrics SIA (Riga, Lettonie) et décrit par Eylenbosch et al. (2017) et Vermeulen et al. (2012)). Ce système permet l'acquisition d'un spectre proche infrarouge de 209 longueurs d'ondes, comprises entre 1118 et 2424 nm, pour chaque pixel de l'image acquise sur un échantillon. L'analyse des spectres permet ensuite de déterminer la nature physico-chimique de l'échantillon à l'échelle du pixel. Cette analyse est basée sur l'utilisation de modèles de discrimination construits à partir de spectres acquis sur des échantillons de référence. La première étape dans la construction de tels modèles consiste donc à identifier l'ensemble des classes présentes au sein des échantillons analysés (dans la cas présent les racines de pois, les racines de froment, les particules de sol résiduelles après lavage des échantillons, les résidus des cultures précédentes et le tamis permettant la récupération des échantillons lors de leur lavage et leur transport durant le séchage et l'acquisition des images hyperspectrales). Des spectres sont ensuite acquis séparément pour chacune de ces classes spectrales avant d'être utilisés pour la construction de modèles de discrimination.

Dans le cas de l'étude présentée, la discrimination a été réalisée grâce à des modèles basés sur l'algorithme SVM (Support Vector Machine) et développés avec le logiciel PLS Toolbox 7.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA). Cet algorithme permet de dégager une fonction qui décrit une limite de décision séparant de manière optimale deux groupes de données (Fernández Pierna et al., 2004 ; Gunn, 1998). Trois modèles SVM étaient agencés au sein d'un arbre de classification dichotomique et étaient donc appliqués successivement sur les spectres extraits des images hyperspectrales. Le premier modèle permettait de reconnaître les spectres correspondant à l'arrière-plan de l'échantillon (bande transporteuse du système d'acquisition des images hyperspectrales et tamis servant au transport des échantillons) ainsi que les spectres des particules de sol et des résidus de cultures parmi l'ensemble des spectres acquis sur l'échantillon étudié. Parmi les spectres autres que ceux reconnus par le premier modèle, le second modèle permettait de reconnaître les spectres de racines de pois. Enfin, le troisième modèle permettait de discriminer les spectres restants en tant que racines de froment et nodosités (Figure 3). Cet arbre de classification a été mis au point en utilisant le logiciel Matlab R2015a (The Math Works, Inc, Natick, MA, USA).

La quantification des racines a ensuite été possible grâce à la relation linéaire existant entre la masse de racines présentes au sein d'un échantillon et le nombre de pixels classés comme étant des racines à l'issue de l'analyse de l'image hyperspectrale de cet échantillon par l'arbre de classification. Cette relation a été établie séparément pour les racines de pois et de froment sur base du nombre de pixels classés comme étant des racines sur des images hyperspectrales acquises sur des échantillons de masses connues ne contenant que des racines d'une seule espèce.

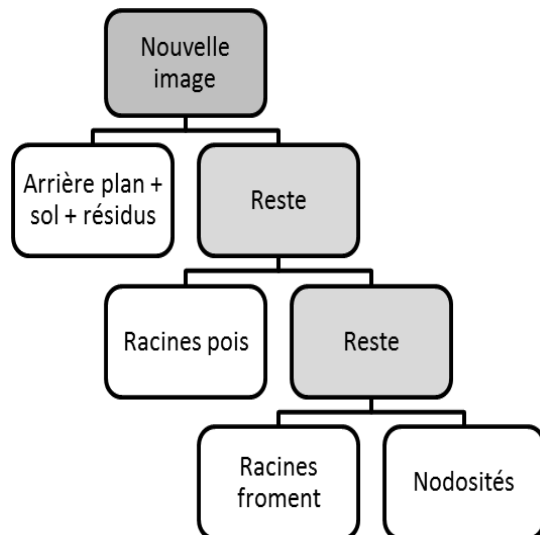


Figure 3 : Arbre de classification dichotomique permettant de déterminer la nature de l'échantillon étudié. Cette détermination est réalisée en analysant le spectre proche infrarouge acquis pour chaque pixel de l'image hyperspectrale. L'analyse est basée sur la succession de trois modèles de discrimination construits avec l'algorithme SVM (Support Vector Machine).

Les modèles de discrimination et les régressions linéaires ont été appliqués sur des échantillons de racines prélevés dans un essai portant sur l'association de pois protéagineux (variété Gangster) et de froment d'hiver (variété Epsou). Cet essai comportait des parcelles de cultures pures et en association. Les densités de semis étaient adaptées aux modalités de culture (pois pur: 80 grains/m², froment pur: 300 grains/m², pois associé: 50 grains/m², froment associé: 150 grains/m²) (Pierreux et al., 2016). Lors du prélèvement (28 juin 2016), les graines de pois étaient complètement formées (stade BBCH 79) et la culture de froment était au stade grain mi-laiteux (BBCH 73).

1.2 Résultats et discussion

Les résultats obtenus lors de la validation des modèles de discrimination sur des images hyperspectrales acquises sur des échantillons composés uniquement de racines de pois ou de racines de froment sont présentés au Tableau 1. L'analyse de ces résultats montre que les racines de pois et de froment sont globalement bien prédites par les modèles (75 % des pixels de racines de pois correctement prédits, 86 % pour les racines de froment) mais qu'il existe néanmoins une certaine confusion qui peut notamment s'expliquer par la qualité des images (rapport signal sur bruit) et par leur résolution spatiale ainsi que par les limites de classification des algorithmes dans la prédiction de la nature des spectres proche infrarouge analysés. Ces résultats montrent également que les spectres des racines ne sont pas confondus avec ceux des nodosités ce qui aura tout son intérêt dans le second cas d'étude présenté dans cet article.

Dans le cadre de cette étude, deux régressions linéaires ont été établies afin de convertir un nombre de pixels de racines en une masse de racines présentes au sein de l'échantillon analysé. Ce nombre de pixels correspondait à un nombre de spectres classés par l'arbre de classification dichotomique comme étant des spectres de racines de pois ou de froment sur l'image hyperspectrale de l'échantillon étudié. La régression établie pour les racines de pois avait un coefficient de détermination (R^2) de 0,76. Celle établie pour les racines de froment avait un R^2 de 0,89. Il est donc évident que la méthode n'est pas adaptée pour quantifier de manière exacte la masse de racines de chacune des espèces au sein d'un échantillon comprenant les racines en mélange. Cependant, **cette méthode d'analyse permet d'estimer rapidement la part de racines de chacune des deux espèces dans l'échantillon étudié et permet de s'affranchir de l'étape de pesée des échantillons.** De plus, grâce au premier modèle de discrimination qui reconnaît les spectres des particules de sol et des résidus de cultures, **cette méthode permet de s'affranchir du tri manuel jusqu'à présent nécessaire après l'étape de lavage des échantillons.**

Tableau 1 : Validation des modèles permettant la discrimination des spectres proche infrarouge de racines de froment et de pois. Validation réalisée en appliquant l'arbre de classification dichotomique sur des images hyperspectrales acquises sur des échantillons contenant uniquement des racines de pois ou des racines de froment. Ces racines ont été prélevées sous des cultures pures et un tri manuel a permis de les séparer des autres éléments présents au sein des échantillons de sol. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentages moyens de spectres classés dans les différentes classes spectrales. Chaque spectre analysé correspond à un pixel d'une image hyperspectrale. Le pourcentage de spectres correctement classés est en caractère gras. Dans le calcul des pourcentages de spectres prédits au sein de chaque classe des modèles, les spectres de l'arrière-plan n'ont pas été pris en compte car ils pouvaient être considérés comme étant parfaitement classés. Tableau extrait de Eylenbosch et al. (2018a).

Images (nombre)	Classification des spectres (Moyenne \pm écart-type)		
	Racines pois	Racines froment	Nodosités
Racine pois (27)	75 \pm 9 %	24 \pm 9 %	1,1 \pm 0,4 %
Racine froment (32)	14 \pm 6 %	86 \pm 6 %	0 \pm 0 %

Lorsque cette méthode a été appliquée sur les échantillons prélevés sous les cultures pures et les cultures associées en fin de cycle de développement, nous avons pu montrer que la densité racinaire (exprimée en g de racines sèches par dm³ de sol) était significativement égale pour les cultures cultivées seules ou en association et cela malgré une densité de semis plus faible pour les deux cultures lorsqu'elles étaient cultivées en association (Eylenbosch et al., 2018a). Les plantes des cultures en association avaient dès lors un meilleur développement racinaire qu'en culture pure. Les mesures réalisées ont également montré que la densité racinaire sous culture pure de pois était toujours inférieure à celle observée sous culture pure de froment ou sous culture associée.

L'association des cultures n'entraverait donc pas le développement des racines des pois et permettrait une meilleure utilisation des ressources du sol par rapport à la culture pure du pois.

2. Cas 2: Quantification de la teneur en leghémoglobine au sein de nodosités individuelles de pois.

La mesure des teneurs en leghémoglobine au sein des nodosités de légumineuses permet d'estimer l'activité des nodosités en termes de fixation d'azote. Cette mesure a par exemple été utilisée pour étudier les effets d'une déficience en soufre chez le pois (Pourmoayyed, 2016 ; Scherer et al., 2008) et pour comparer des plants mutants de pois supernodulants par rapport aux cultivars parents (Škrdleta et al., 1994). La méthode de quantification utilisée dans ces études était basée sur la méthode de quantification de l'hémoglobine humaine dans le sang adaptée par Wilson et Reisenauer (1963) pour quantifier la leghémoglobine au sein de nodosités. Cette méthode a servi de référence à la mise au point de la méthode de quantification basée sur l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge (Eylenbosch et al., 2018b).

2.1 Matériels et méthodes

Les nodosités ayant servi à la mise au point des modèles de quantification ont été obtenues sur des plants de pois protéagineux d'hiver cultivés en serre. Des prélèvements de racines ont été réalisés une fois par semaine durant quatre semaines consécutives. Après lavage des racines, les nodosités ont été détachées. Pour chaque pot de culture (trois plants de pois par pot), une partie des nodosités a directement été congelée à -80°C. Le reste des nodosités a été séché à 60°C dans une étuve avec ventilation forcée. Les nodosités congelées ont de leur côté été broyées puis plongées dans une

solution permettant d'extraire la leghémoglobine (100 mg nodosités + 3 x 0,6 ml de solution de Drabkin). Après centrifugation de la solution, une lecture par spectrophotométrie à 540 nm a été réalisée (spectrophotomètre UV-visible UV-1650 PC, Shimadzu, Japon). Afin de déterminer la teneur en leghémoglobine de cette solution, la valeur d'absorbance de la solution a été comparée aux valeurs d'absorbance obtenues pour des solutions contenant des valeurs connues d'hémoglobine humaine selon la méthode de Wilson et Reisenauer (1963). Les nodosités séchées ont quant à elles été utilisées pour l'acquisition des images hyperspectrales proche infrarouge desquels les spectres ont été extraits. Le même système d'imagerie que celui décrit dans le cas d'étude précédent a été utilisé. Pour chaque échantillon de nodosités, un spectre moyen a été calculé. Un modèle de quantification basé sur l'algorithme de régression PLS (Partial Least Square ; Wold et al., 2001) a ensuite été créé en mettant en relation ces spectres moyens avec les teneurs en leghémoglobine correspondantes obtenues sur les nodosités congelées. Ce modèle a été construit avec le logiciel PLS Toolbox 7.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA) sur base des valeurs d'absorbance à 150 longueurs d'onde comprises entre 1432 et 2368 nm. Un modèle simplifié a également été construit avec l'absorbance à sept longueurs d'onde sélectionnées sur base de leur contribution dans le modèle complet (longueurs d'onde 1461, 1537, 1732, 1934, 2022, 2110 et 2236 nm). Cette simplification a été réalisée dans le but de transférer le modèle sur des systèmes d'acquisition plus simples et dès lors moins coûteux (Eylenbosch et al., 2018b).

Le modèle complet a ensuite été appliqué sur des nodosités de pois protéagineux d'hiver obtenues en conditions réelles de culture au cours de la saison culturale 2017-2018 (Dumont de Chassart, 2018). Pour obtenir ces nodosités, le système racinaire complet des plantes de pois a été extrait du sol avec une bêche. Les racines et le sol ont ensuite été séparés par lavage à l'eau puis les racines ont été séchées à 60°C. Ces extractions ont été réalisées dès la sortie de l'hiver à raison d'un prélèvement de cinq plantes toutes les deux semaines de manière à suivre l'évolution des teneurs en leghémoglobine au sein des nodosités jusqu'à la floraison de la culture. Afin de déterminer les teneurs en leghémoglobine des nodosités sans devoir les séparer préalablement des racines de pois, les modèles de quantification présentés dans ce second cas d'étude ont été associés à des modèles de discrimination tels que présentés dans le premier cas d'étude. Ces modèles de discrimination permettaient de discriminer la bande transporteuse du système d'acquisition des images hyperspectrales, les racines de pois et les nodosités. Après avoir prédit la nature des pixels un à un, un modèle d'analyse d'image a permis de déterminer la position des nodosités au sein des échantillons. Pour cela, tout agglomérat de plus de 10 pixels dont les spectres correspondaient à des nodosités étaient considérés comme appartenant à une même nodosité. Vu la configuration de la caméra, la surface de 10 pixels correspondait à une surface d'environ 1 mm². Ce modèle était basé sur un algorithme d'analyse de particules développé avec le logiciel Mia Toolbox (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA). Cette analyse d'image a ensuite permis de dénombrer les nodosités sur les images et de calculer un spectre moyen pour chaque nodosité. Le modèle de quantification a ensuite été appliqué sur le spectre moyen de chaque nodosité individuelle. Grâce à la discrimination des racines et des nodosités sur base de l'allure de leurs spectres proche infrarouge, les nodosités ne devaient plus être séparées manuellement des racines. Connaissant la nature et la teneur en leghémoglobine de chaque pixel de l'image hyperspectrale, nous avons pu construire une nouvelle image des échantillons en assignant une couleur aux pixels correspondants aux nodosités en fonction de leur teneur en leghémoglobine. Grâce à cela, il a été possible de caractériser la répartition des teneurs en leghémoglobine au sein des différentes nodosités des systèmes racinaires étudiés (Eylenbosch, 2018).

2.2 Résultats et discussion

Le modèle complet obtenu à partir de 22 échantillons de nodosités avait un R² de 0,87 et une erreur quadratique moyenne de calibration (RMSEC) de 0,32. Appliqué sur huit échantillons indépendants, ce

modèle avait un R^2 de 0,90 et une erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP) de 0,27. Le modèle simplifié avait des performances similaires (R^2 validation = 0,86; RMSEP = 0,31) (Eylenbosch et al., 2018b). **Les résultats obtenus montrent donc une bonne capacité des modèles à prédire la teneur en leghémoglobine au sein de nodosités de pois protéagineux sur base de l'analyse de leurs spectres proche infrarouge.** De plus, par rapport à la méthode de référence, **cette nouvelle méthode de quantification n'utilise aucun réactif chimique, limite fortement les erreurs de manipulation et est beaucoup plus rapide.**

Les mesures réalisées par Dumont de Chassart (2018) ont cependant montré la sensibilité de la méthode de quantification aux conditions de préparation des échantillons. Si les nodosités étudiées n'étaient pas séchées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour construire le modèle de quantification, un changement de couleur des nodosités était observé et les prédictions obtenues étaient erronées. Cette observation a donc mis en évidence l'importance de respecter un mode opératoire strict pour préparer les échantillons.

Lorsque le modèle complet a été appliqué sur les nodosités utilisées pour construire les modèles en ne calculant plus un spectre moyen par échantillon mais un spectre par nodosité, les résultats ont montré une forte hétérogénéité des teneurs en leghémoglobine au sein des échantillons de nodosités (Figure 4). Cette hétérogénéité augmentait avec l'âge des plants sur lesquels les nodosités avaient été prélevées. Une hétérogénéité des teneurs en leghémoglobine au sein des nodosités d'une même plante avait aussi été mesurée par Sato et al. (1998) sur des plants de soja qui avaient des nodosités de tailles différentes et pour lesquels la teneur en leghémoglobine augmentait avec la taille des nodosités. **Nos mesures ont donc mis en évidence qu'il est possible de mesurer les teneurs en leghémoglobine au sein de nodosités individuelles avec l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge ce qui n'était jusqu'à présent pas possible avec la méthode de référence.**

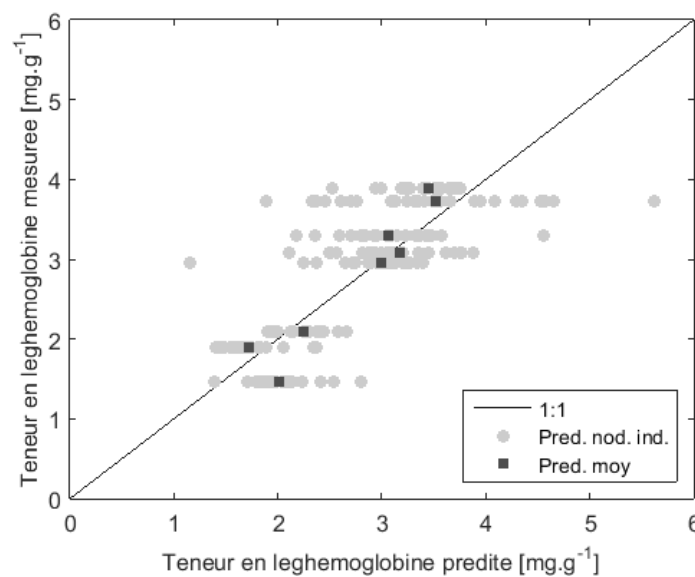


Figure 4 : Teneurs en leghémoglobine prédites sur des nodosités individuelles (mg leghémoglobine g^{-1} nodosités fraîches). Les prédictions des teneurs en leghémoglobine ont été réalisées sur le spectre moyen calculé individuellement pour chaque nodosité (cercles gris). Ces nodosités provenaient de huit échantillons (set de validation). La teneur moyenne en leghémoglobine (carrés noirs) prédite sur l'entièreté de chaque échantillon a été mise en relation avec la valeur de référence de leghémoglobine (valeur mesurée) obtenue pour l'échantillon avec la méthode de référence. Figure adaptée de Eylenbosch et al. (2018b).

Dans l'étude menée sur des systèmes racinaires de pois obtenus dans des conditions réelles de culture, le modèle complet a permis de suivre l'évolution des teneurs en leghémoglobine au cours de six prélèvements espacés de deux semaines (Dumont de Chassart, 2018). Les prédictions des teneurs en

leghémoglobine au sein des nodosités ont mis en évidence une stagnation des valeurs moyennes entre la sortie de l'hiver (fin février) et la fin du mois de mars. Il y a ensuite eu une rapide augmentation des teneurs en leghémoglobine qui a atteint un palier lors de l'initiation de la floraison, au début du mois de mai (Figure 5). Les mesures n'ont pas été poursuivies dans la saison mais, selon plusieurs auteurs, une décroissance de ces teneurs aurait dû être observée dès le début du remplissage des graines (Voisin et Gastal, 2015 ; Dilworth, 1980).

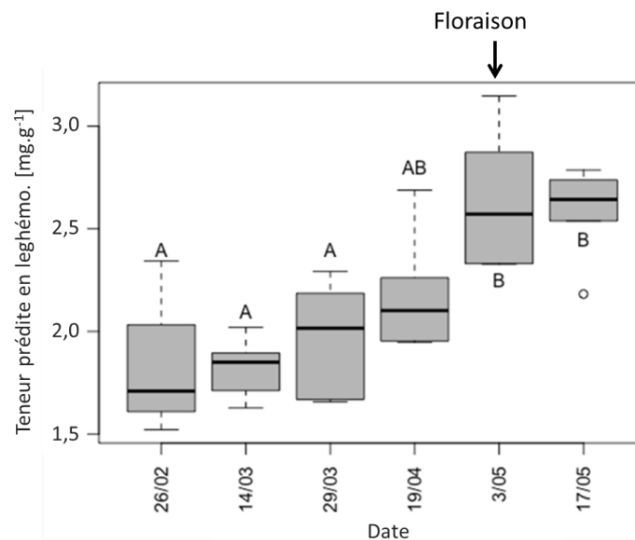


Figure 5 : Evolution des teneurs moyennes en leghémoglobine (mg leghémoglobine g⁻¹ nodosités fraîches) prédites sur des images hyperspectrales proche infrarouge acquises sur des échantillons de nodosités sèches. Les nodosités ont été prélevées à un intervalle de deux semaines entre la sortie de l'hiver et le début de la floraison. Les lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes (ANOVA, p-valeur < 0,001). Figure adaptée de Dumont de Chassart (2018).

3. Discussion générale et conclusions

Les résultats obtenus dans **ces études utilisant les propriétés de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée à la chimiométrie**, soit pour discriminer et quantifier des racines de différentes espèces (Eylenbosch et al., 2018a), soit pour mesurer des teneurs en leghémoglobine au sein de nodosités de pois protéagineux (Dumont de Chassart, 2018 ; Eylenbosch et al., 2018b), **démontrent l'intérêt de cette méthode d'analyse dans les études sur les systèmes racinaires des légumineuses**. Bien que les valeurs obtenues par les prédictions sur les images hyperspectrales ne soient pas exactes (notamment en ce qui concerne les prédictions de biomasses racinaires), **cette méthode d'analyse permet de réaliser des comparaisons et d'obtenir des informations qui étaient jusqu'à présent difficilement ou non accessibles avec les méthodes de référence**. L'analyse combinée des spectres proche infrarouge des pixels et du nombre ou de la répartition de ces pixels sur les images permet en effet d'obtenir des informations (i) sur la quantité de racines de différentes espèces au sein d'un mélange (ce qui n'était pas ou difficilement faisable par tri manuel) ou (ii) sur des teneurs en leghémoglobine au sein de nodosités individuelles (valeurs qui n'étaient pas accessibles lorsque la leghémoglobine devait être extraite en vue de sa quantification).

De manière à obtenir des valeurs prédites sur base de l'analyse des images hyperspectrales aussi proches que possible de la réalité, les recherches récentes sur l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale dans l'étude des systèmes racinaires ont montré l'importance d'acquérir des images avec un système d'imagerie stable (qui donne les mêmes valeurs d'absorbance lorsqu'un échantillon est analysé plusieurs fois de suite), de bien répartir les échantillons pour limiter tant que possible le recouvrement

de leur composants lors de la prise d'image et de calibrer des modèles robustes qui tiennent compte d'un maximum de variabilité spectrale au sein des échantillons analysés (Eylenbosch, 2018).

Si l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale dans l'étude de systèmes racinaires n'en est qu'à ses débuts, elle ouvre néanmoins de nombreuses perspectives en termes de compréhension du fonctionnement de systèmes de culture complexes (par exemple des associations de cultures) ou en termes de sélection variétale. L'imagerie hyperspectrale proche infrarouge pourrait en effet certainement être utilisée pour identifier plus rapidement des variétés avec un pouvoir d'enracinement, de nodulation ou de fixation d'azote plus important ou des souches bactériennes qui permettraient une meilleure fixation symbiotique.

Il est néanmoins important de préciser que si l'acquisition des images hyperspectrales est relativement simple, le développement des modèles de discrimination et de quantification demande quant à lui des compétences spécifiques en chimiométrie. Ces compétences nécessaires à l'interprétation des données, le temps requis pour le développement des modèles d'analyse d'images hyperspectrales et le coût des systèmes d'acquisitions des images peuvent actuellement encore constituer des freins à une utilisation plus large de cette technique d'analyse dans la recherche agronomique. La mise en évidence d'une aussi bonne prédiction des teneurs en leghémoglobine avec un modèle construit avec les valeurs d'absorbance de sept longueurs d'onde qu'avec un modèle construit avec 150 longueurs d'onde laisse cependant entrevoir des possibilités en termes de développement de systèmes d'acquisition d'images multi-spectraux (plus simples et moins coûteux) pour quantifier la leghémoglobine au sein de nodosités.

La rapidité de mesure et la possibilité de pouvoir mesurer la teneur en leghémoglobine de nodosités de manière non-destructive et directement sur les systèmes racinaires ouvre des perspectives en termes de fréquence de mesure. Si des modèles pouvaient être développés sur des nodosités fraîches, l'analyse de systèmes racinaires obtenus en aéroponie pourrait ouvrir de nouvelles voies de recherches. Le développement d'un protocole permettant la détection des nodosités et la mesure de leurs teneurs en leghémoglobine dans ces conditions de culture doit cependant encore être réalisé. Les performances de ce protocole dépendront dans une certaine mesure de la manière dont l'eau présente au sein des racines et des nodosités de légumineuses masquera ou non l'information utile au sein du spectre infrarouge.

D'autres paramètres des systèmes racinaires pourraient encore être mesurés sur les images hyperspectrales en plus des paramètres chimiques. Les modèles d'analyse d'images, tel que celui utilisé pour détecter les nodosités sur les images hyperspectrales, permettent de compter le nombre de nodosité. D'autres modèles pourraient être appliqués sur les mêmes images hyperspectrales pour en extraire un plus grand nombre d'informations et mesurer par exemple des paramètres de l'architecture racinaire tels que la longueur des racines et leur ramification (dans la mesure où les systèmes racinaires sont extraits entiers et ne sont pas fragmentés lors du lavage). Tout comme cela a été fait pour les racines, une mesure de la biomasse de nodosités pourrait également être réalisée sur les images hyperspectrales sur base du nombre de pixels détectés comme étant des nodosités. L'équation de la régression linéaire permettant de convertir un nombre de pixels de nodosités en une masse de nodosités devrait alors être calculée.

Grâce à toutes ces possibilités offertes par l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale dans l'étude de systèmes racinaires, cette méthode d'analyse semble être un outil intéressant pour mieux comprendre le développement et le fonctionnement de systèmes racinaires de légumineuses, cultivées en pure ou en association, en conditions réelles de culture ou en conditions artificielles, et pourrait aider à développer les cultures de légumineuses du futur.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Pierre Delaplace, Loïc Dewaele, Ariel Doudet, Florent Druart, Benjamin Dumont, Louis Dumont de Chassart, Nicaise Kayoka Mukendi, Laëtitia Machiels, Jérôme Pierreux, Audrez Sougnez, Marine Torfs et Damien Vincke pour leur aide précieuse dans l'acquisition et l'interprétation des données présentées dans cet article.

Références bibliographiques

- Appleby C.A., 1984. Leghemoglobin and rhizobium respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 443–478.
- Becana M., et al., 1995. Structure and function of leghemoglobins. *An. Estac. Exp. Aula Dei*, 21(3), 203–208.
- Bedoussac L., et al., 2015. Ecological principles underlying the increase of productivity achieved by cereal-grain legume intercropping in organic farming. A review. *Agron Sustain Dev*, 35, 911–935.
- Carton N., 2017. Interactions induites par l'association du lupin avec une céréale, effets sur les adventices et conséquences sur la productivité. Thèse de doctorat, Univ. d'Angers, France, 205 p.
- Dale L.M., et al., 2012. Chemometric tools for NIRS and NIR Hyperspectral Imaging. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(1), pp.70–76.
- Dale L.M., et al., 2013. Hyperspectral Imaging Applications in Agriculture and Agro-Food Product Quality and Safety Control: A Review. *Appl Spectrosc Rev*, 48(2), 142–159.
- Dilworth M.J., 1980. Leghemoglobins. *Methods Enzymol.*, 69, 812–823.
- Downie J.A., 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol*, 15(6), 196–198.
- Dumont de Chassart L., 2018. Evaluation de l'activité fixatrice d'azote de nodosités de pois protéagineux par imagerie hyperspectrale proche infrarouge. Mémoire de fin d'études, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique, 79 p.
- Eylenbosch D., 2018. Evaluation des potentialités de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge et de la chimométrie dans l'étude de systèmes racinaires. Thèse de doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique, 227 p.
- Eylenbosch D., et al., 2017. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the discrimination of roots and crop residues extracted from soil samples. *J. Chemom*, 32(1), 1–11.
- Eylenbosch D., et al., 2018a. Utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée aux outils de la chimométrie dans l'étude de systèmes racinaires. In Mathieu J., Gate P. (Eds), *Phloèmes - Actes du congrès*, Paris, Arvalis - Institut du végétal, pp. 226–236.
- Eylenbosch D., et al., 2018b. Quantification of leghaemoglobin content in pea nodules based on near infrared hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics. *J. Spectral Imaging*, 7(a9), 1–10.
- Fernández Pierna J.A., et al., 2004. Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J. Chemom*, 18(7–8), 341–349.
- Fernández Pierna J.A. et al., 2012. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. *Chemometr Intell Lab*, 117, 233–239.
- Fujita K., Ofosu-Budu K.G., Ogata S., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. *Plant and Soil*, 141, 155–175.
- Gunn S.R., 1998. Support vector machines for classification and regression. Rapport technique, Université de Southampton, 54 p.
- Jun H.K., Sarath G., Wagner F.W., 1994. Detection and purification of modified leghemoglobins from soybean root nodules. *Plant Sci.*, 100(1), 31–40.
- Nkrumah B., et al., 2011. Hemoglobin estimation by the HemoCue portable hemoglobin photometer in a resource poor setting. *BMC Clinic Pathol*, 11, 1–6.

- Pierreux J. et al., 2016. L'intérêt de la culture en association de froment et de pois protéagineux d'hiver dans un objectif d'autonomie protéique. In Watillon B., Bodson B. (Eds), Livre Blanc Céréales, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique, p. 10/2-9.
- Pourmoayyed P., 2016. The effect of sulfur deficiency in pea (*Pisum sativum*) on factors related to nitrogen fixation and on sulfate transporters. Thèse de doctorat, Université de Bonn, Allemagne, 99 p.
- Sato T., et al., 1998. Determination of leghemoglobin components and xylem sap composition by capillary electrophoresis in hypernodulation soybean mutants cultivated in the field. *Soil Sci Plant Nutr*, 44(4), pp.635–645.
- Scherer H.W., et al., 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biol Fert Soils*, 44(7), 909–916.
- Schwanninger M., Rodrigues J.C., Fackler K., 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *J. Near Infrared Spectrosc*, 19, 287–308.
- Škrdleta V., Novak K., Lisá L., 1994. Comparison of two *Pisum sativum* nodulation mutants with their parental cultivar. *Biologia Plantarum*, 36(3), 435–441.
- Srivastava T., et al., 2014. Methods for hemoglobin estimation: a review of “what works” *J Hematol Transfus*, 2(3), 2005–2006.
- Taiz L., Zeiger E., 2002. *Plant physiology*, third edition, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Thilakarathna M.S. et al., 2016. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under managed herbaceous cropping systems . A review. *Agron. Sustain. Dev*, 36(58), 1-16.
- Vermeulen P., et al., 2012. Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using near infrared hyperspectral imaging. *Food Addit Contam A*, 29(2), 232–240.
- Voisin A.S., Gastal F., 2015. Nutrition azotée et fonctionnement agrophysiologique spécifique des légumineuses. In Schneider A., Huyghe C. (Eds), *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables*, Editions Quae, Versailles. pp 79–138.
- Wilson D.O., Reisenauer H.M., 1963. Determination of leghemoglobin in legume nodules. *Anal Biochem*, 6, 27–30.
- Wittenberg J., et al., 1974. Facilitated oxygen diffusion. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4057–4066.
- Wold S., Sjöström M., Eriksson L., 2001. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109–130.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).