

## Evaluation de l'activité fixatrice d'azote de nodosités de pois protéagineux par imagerie hyperspectrale proche infrarouge

**Auteur** : Dumont de Chassart, Louis

**Promoteur(s)** : Bodson, Bernard

**Faculté** : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme** : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique** : 2017-2018

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/5172>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

# **ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ FIXATRICE D'AZOTE DE NODOSITÉS DE POIS PROTÉAGINEUX PAR IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE**

**LOUIS DUMONT DE CHASSART**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE : 2017-2018**

**PROMOTEUR : Professeur BERNARD BODSON**  
**ENCADRANT : DAMIEN EYLENBOSCH**

*© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tech.*

*Le présent document n'engage que son auteur.*

---

<sup>1</sup> Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT.

# **ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ FIXATRICE D'AZOTE DE NODOSITÉS DE POIS PROTÉAGINEUX PAR IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE**

**LOUIS DUMONT DE CHASSART**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE : 2017-2018**

**PROMOTEUR : Professeur BERNARD BODSON**  
**ENCADRANT : DAMIEN EYLENBOSCH**

# REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont apporté leur aide, leurs conseils et leur soutien dans la réalisation de ce travail de fin d'étude.

Et tout particulièrement, je tiens aussi à remercier :

Monsieur Bernard Bodson, mon promoteur et professeur dans l'Unité de Phytotechnie tempérée, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans l'Unité, ainsi que pour avoir enseigné et transmis toute son expérience durant ces 5 années d'études. Ceci m'a permis d'avoir un regard critique sur ce que j'entreprends aujourd'hui.

Monsieur Damien Eylenbosch, doctorant dans l'Unité de Phytotechnie tempérée, pour m'avoir encadré et fait part de ses conseils judicieux durant tout ce travail, que ce soit à partir du brainstorming, à la mise en place des protocoles expérimentaux jusqu'à la rédaction.

Monsieur Delaplace et son Unité de Biologie Végétale, pour le temps qu'ils m'ont consacré et leur encadrement dans la réalisation des manipulations en laboratoire nécessaires à la réalisation de ce travail.

Monsieur Vincent Baeten et son Département au Centre de Recherche Agricole Wallon (CRA-W), pour m'avoir permis d'utiliser la camera hyperspectrale essentielle à la réalisation de ce travail de fin d'étude.

Monsieur Damien Vinck et Monsieur Benjamin Dumont, pour avoir partagé leurs compétences en informatique qui m'ont permis de représenter visuellement les teneurs en leghémoglobine des nodosités qui ont été prédites sur les images hyperspectrales acquises dans ce travail de fin d'étude.

Madame Christine Cartrysse et son asbl « Association pour la Promotion des Protéagineux et des Oléagineux », pour m'avoir permis de réaliser des prélèvements dans leurs parcelles.

Monsieur Jérôme Pierreux, pour ses bons conseils concernant les cultures en associations.

Toute l'équipe de l'Unité Phytotechnie tempérée et de la Ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech avec qui le travail a toujours été réalisé dans la bonne humeur.

Mes parents, ma famille et mes proches qui m'ont soutenu dans la réalisation de ce travail.

Enfin, je tiens aussi à remercier tous les étudiants avec qui j'ai pu vivre des moments inoubliables depuis mon arrivée à Gembloux jusqu'à la rédaction de ce travail de fin d'étude.

# RÉSUMÉ

L'agriculture intensive d'aujourd'hui recourt essentiellement aux engrais azotés de synthèse. Les légumineuses, en symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, permettent de s'affranchir partiellement de ces engrais de synthèse en fixant de l'azote atmosphérique au niveau de leurs nodosités, tout en produisant des graines riches en protéines. De plus, elles permettent aussi de restituer des reliquats azotés pour les cultures suivantes. Afin d'améliorer ces connaissances sur le sujet, ce travail vise à évaluer l'activité fixatrice de l'azote de pois protéagineux par imagerie hyperspectrale proche infrarouge. Deux axes ont été organisés dans ce travail. Le premier vise à établir les conditions qui permettent de mesurer par imagerie hyperspectrale proche infrarouge la teneur en leghémoglobine, une molécule indicatrice de l'activité fixatrice de l'azote, au sein des nodosités de pois protéagineux (*Pisum sativum* L.). Le second axe vise à analyser la teneur en leghémoglobine dans les différentes cultures de pois (en culture pure d'hiver, de printemps et en association) et de comparer l'effet de plusieurs modes de conduite de la culture. Il est apparu que le type de séchage des nodosités est une étape cruciale dans la préparation des échantillons avant d'acquérir leurs images hyperspectrales. En effet, les types de séchage analysés sembleraient induire des propriétés physico-chimiques différentes qui ne permettent pas de les quantifier de la même manière. Dans le second axe, il a été mis en évidence que la teneur en leghémoglobine prédite au sein des nodosités soit liée en début de culture au stade d'avancement de la plante de pois et que les nodosités issues de l'association auraient l'aptitude en fin de culture à rester plus longtemps actives et ce jusqu'au stade remplissage du grain de froment.

# ABSTRACT

Today's intensive agriculture relies heavily on synthetic fertilizers. Legumes, in symbiosis with bacteria of the genus *Rhizobium*, make it possible to get rid of these synthetic fertilizers by fixing the atmospheric nitrogen in their nodules, while producing seeds rich in proteins. In addition, they also make it possible to render nitrogen residues for the following crops. In order to improve knowledge on the subject, this work is intended to assess the nitrogen-binding activity of proteaginous pea by near-infrared hyperspectral imaging. This paper is organized in two main parts. The first part aims to establish the conditions which allow the measurement of the content of leghemoglobin, a molecule indicative of the nitrogen-fixing activity, by hyperspectral near infrared imaging within the nodules of proteaginous pea (*Pisum sativum* L.). The second part focuses on the leghemoglobin content of nodules in the different pea crops (in pure winter, spring and associated cultures) and compare the effect of several methods of crop management on it. It is obvious that the way of drying nodules is a crucial step during the sample preparation before acquiring their hyperspectral images. Indeed, the way of drying nodules seems to induce different physicochemical properties that do not allow to quantify them in the same way. In the second part, it has been demonstrated that the predicted leghemoglobin content of nodules is linked at the beginning of the culture to the stage of advancement of the plant and that the nodules from the associated culture would have the aptitude at the end of the culture to remain longer active till the filling stage of the wheat grain.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ .....	V
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX .....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XII
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>2</b>
<b>1 LE POIS PROTEAGINEUX.....</b>	<b>2</b>
1.1 <i>La classification.....</i>	2
1.2 <i>Les problématiques d'emblavement.....</i>	2
1.2.1 L'histoire .....	2
1.2.2 La concurrence par rapport aux autres cultures .....	3
1.3 <i>Le progrès .....</i>	3
1.4 <i>Les débouchés.....</i>	4
1.5 <i>La culture .....</i>	5
1.5.1 La place dans la rotation.....	5
1.5.2 Les facteurs limitants de la culture.....	5
1.5.3 Les avantages agronomiques et environnementaux.....	6
<b>2 L'ARCHITECTURE RACINAIRE ET SA FIXATION SYMBIOTIQUE.....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Système végétatif du pois.....</i>	6
2.2 <i>Système racinaire du pois .....</i>	7
2.2.1 La mise en place du système racinaire .....	7
2.3 <i>Développement des nodosités sur le système racinaire .....</i>	8
2.3.1 Les plantes et l'azote .....	8
2.3.2 La formation des nodosités .....	9
2.3.3 Morphologie et distribution spatiale des nodosités.....	10
2.3.4 Distribution dans le temps de la fixation symbiotique des nodosités .....	11
2.4 <i>Fixation de l'azote.....</i>	12
2.4.1 Biochimie de la fixation d'azote .....	12
2.4.2 L'assimilation et l'exportation de l'azote fixé.....	13
2.4.3 Nitrogénase et l'oxygène.....	13
2.5 <i>Leghémoglobine .....</i>	14
2.5.1 Structure et fonction .....	14
2.5.2 Relation entre Leghémoglobine et l'azote fixé symbiotiquement .....	14
<b>3 LA CULTURE ASSOCIÉE DES CÉRÉALES ET LÉGUMINEUSES.....</b>	<b>15</b>
3.1 <i>Introduction .....</i>	15
3.2 <i>Avantages et inconvénients des cultures en association .....</i>	15
3.3 <i>La nutrition azotée de l'association des céréales et des légumineuses .....</i>	16
<b>4 L'IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE .....</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Introduction .....</i>	17
4.2 <i>Son utilisation et ses avantages.....</i>	18
4.3 <i>Détection, discrimination des nodosités et des racines .....</i>	19
4.4 <i>Propriétés spectrales de la leghémoglobine et sa quantification .....</i>	21
<b>5 L'IMPACT GÉNÉTIQUE SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE.....</b>	<b>21</b>

5.1	<i>Variabilité intraspécifique</i> .....	21
<b>6</b>	<b>L'IMPACT DU PHOSPHORE ET DU MOLYBDENE SUR LA CROISSANCE ET LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE CHEZ LE POIS.</b> .....	<b>22</b>
6.1	<i>Le phosphore</i> .....	22
6.1.1	Introduction.....	22
6.1.2	Une carence en phosphore, un facteur limitant pour la fixation de N <sub>2</sub> .....	23
6.1.3	L'impact du phosphore sur la croissance et la fixation symbiotique de N <sub>2</sub> .....	24
6.2	<i>Le molybdène</i> .....	25
6.2.1	Introduction.....	25
6.2.2	Le rôle du molybdène dans la plante et sur la fixation symbiotique de N <sub>2</sub> .....	25
6.3	<i>Le molybdène et le phosphore en fumure associée</i> .....	25
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET METHODE</b> .....	<b>26</b>
<b>1</b>	<b>CONDITIONS ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX</b> .....	<b>26</b>
1.1	<i>Les sites expérimentaux et l'aperçu climatique</i> .....	26
1.2	<i>Généralités</i> .....	27
1.3	<i>Dispositifs et protocoles expérimentaux</i> .....	27
1.3.1	Parcelle « Pois d'hiver ».....	27
1.3.2	Pois de printemps.....	28
1.3.2.1	Parcelle « Pois de printemps – Fumure » .....	28
1.3.2.2	Parcelle « Pois de printemps – variété » .....	28
1.3.3	Pois en association avec du froment .....	29
1.4	<i>Prélèvement des échantillons</i> .....	29
1.4.1	Prélèvement racinaire .....	29
1.4.2	Autres mesures.....	30
1.4.3	Suivi dynamique du système racinaire des plantes et des teneurs en leghémoglobine des nodosités du pois d'hiver.....	30
1.5	<i>Préparation des échantillons</i> .....	31
1.5.1	Généralités pour toutes les expériences .....	31
1.5.2	Cas particulier de l'expérience « pois d'hiver » .....	32
<b>2</b>	<b>ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR IMAGERIE HYPERSPECTRALE PROCHE INFRAROUGE</b> .....	<b>32</b>
2.1	<i>Acquisition des images hyperspectrales proches infrarouge</i> .....	32
2.2	<i>Vérification des acquisitions spectrales</i> .....	33
2.3	<i>Analyse des images hyperspectrales</i> .....	34
<b>3</b>	<b>CALIBRATION DU MODELE DE REGRESSION ENTRE LE CONTENU EN LEGHEMOGLOBINE ET LES SPECTRES PROCHE INFRAROUGE CORRESPONDANT DES NODOSITES</b> .....	<b>36</b>
3.1	<i>Prélèvement des nodosités</i> .....	36
3.2	<i>Quantification chimique</i> .....	36
3.3	<i>Acquisition des spectres NIR et prétraitement</i> .....	37
3.4	<i>Relier l'imagerie hyperspectrale NIR à la teneur en leghémoglobine</i> .....	38
<b>4</b>	<b>DIFFICULTES RENCONTREES</b> .....	<b>38</b>
4.1	<i>Difficultés expérimentales en champs</i> .....	38
4.2	<i>Difficultés dans la calibration du modèle</i> .....	39
<b>5</b>	<b>ANALYSE STATISTIQUE</b> .....	<b>39</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>VALIDATION DES MODELES DE REGRESSION PLS</b> .....	<b>40</b>
1.1	<i>Discussion de la validation du modèle de régression PLS 2018</i> .....	40
1.2	<i>Comparaison de la prédiction de la teneur en Lb des nodosités séchées dans une étuve par convection et dans une étuve ventilée</i> .....	41
1.2.1	Introduction.....	41
1.2.2	Illustration des résultats .....	43
1.2.2.1	Pourcentage de nodosités prédites .....	43
1.2.2.2	Concentration maximale de la teneur en Lb au sein d'une nodosité .....	44



1.2.2.3	Concentration moyenne en Lb de toutes les nodosités d'une image prédite .....	45
1.2.3	Comparaison du modèle de régression PLS 2018 et 2017 .....	46
1.3	<i>Discussion des résultats</i> .....	48
<b>2</b>	<b>EVOLUTION DE LA TENEUR EN Lb DES NODOSITES DANS LE TEMPS .....</b>	<b>49</b>
2.1	<i>L'évolution de la teneur en Lb des nodosités dans l'espace et le temps.</i> .....	49
2.1.1	La teneur moyenne en Lb ( $\text{mg g}^{-1}$ ) des nodosités au cours du temps .....	50
2.1.2	La teneur moyenne minimale en Lb d'une nodosité au cours du temps .....	50
2.1.3	La teneur moyenne maximale en Lb d'une nodosité au cours du temps.....	50
2.1.4	Discussion des résultats.....	51
2.2	<i>Comparaison de l'évolution de la teneur en leghémoglobine (Lb) entre le pois d'hiver et de printemps avant et après la floraison.</i> .....	51
2.2.1	Evolution de la teneur en leghémoglobine des deux cultures de pois.....	51
2.2.2	Comparaison de la teneur en Lb au stade « début de floraison » entre les deux cultures de pois.....	52
2.2.3	Discussion des résultats.....	53
2.3	<i>Répartition des nodosités et de leur teneur en Lb sur un système racinaire complet.</i> .....	53
2.3.1	Représentation dans le temps des nodosités et leurs teneurs en Lb.....	53
2.3.2	La comparaison des teneurs en Lb des nodosités primaires et secondaires .....	55
2.3.3	Discussion des résultats.....	56
<b>3</b>	<b>LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE CHEZ LES DIFFERENTES VARIETES DE POIS D'HIVER.....</b>	<b>57</b>
3.1	<i>Introduction</i> .....	57
3.2	<i>Interprétation des résultats</i> .....	57
3.2.1	Teneur en Lb moyenne d'une nodosité au cours du temps .....	57
3.2.2	Evolution de la teneur maximale en Lb des nodosités .....	59
3.2.3	Evolution du nombre de nodosités dans les premiers centimètres du sol sur le système racinaire de différentes variétés .....	60
3.3	<i>Discussion des résultats</i> .....	61
<b>4</b>	<b>LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE DE LA CULTURE DE POIS EN ASSOCIATION AVEC DU FROMENT</b>	<b>63</b>
4.1	<i>Introduction</i> .....	63
4.2	<i>Interprétation des résultats</i> .....	63
4.2.1	Teneur moyenne en Lb des nodosités.....	63
4.2.2	Teneur maximale en Lb des nodosités .....	64
4.2.3	Teneur minimale en Lb des nodosités .....	64
4.2.4	Biomasse aérienne et évolution du nombre de nodosités au cours du temps. ....	64
4.3	<i>Discussion des résultats</i> .....	65
<b>5</b>	<b>LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE CHEZ LES DIFFERENTES VARIETES DE POIS DE PRINTEMPS .....</b>	<b>66</b>
5.1	<i>Introduction</i> .....	66
5.2	<i>Interprétation des résultats</i> .....	66
5.2.1	La teneur en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol .....	66
5.2.2	Teneur moyenne en Lb des nodosités.....	66
5.2.3	Teneur maximale en Lb des nodosités .....	67
5.2.4	Biomasse aérienne .....	68
5.3	<i>Discussion des résultats</i> .....	69
<b>6</b>	<b>LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE POUR DIFFERENTES FUMURES APPLIQUEES A UNE CULTURE DE POIS DE PRINTEMPS.....</b>	<b>70</b>
6.1	<i>Introduction</i> .....	70
6.2	<i>Interprétation des résultats</i> .....	70
6.2.1	La teneur en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol .....	70
6.2.2	Teneur moyenne en Lb des nodosités.....	71
6.2.3	Teneur maximale en Lb des nodosités .....	71
6.2.4	Biomasse aérienne et mesure du pH.....	72
6.3	<i>Discussion des résultats</i> .....	73
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>76</b>
<b>VII.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>80</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure 1: Evolution des surfaces de trois cultures de protéagineux dans l'UE (Prolea, 2009). .....	3
Figure 2: Schéma général d'une plante de pois (Lecoeur et Turc, 1994). .....	7
Figure 3: Schéma du mécanisme d'infection qui provoque la formation d'une nodosité (Hopkins, 2003). .....	10
Figure 4: Représentation schématique d'une nodosité indéterminée (Dupont et al., 2012). .....	11
Figure 5: La réaction catalytique de la nitrogénase. (Taiz et al., 2014) .....	13
Figure 6: Schématisation du cube de données (hypercube) acquis par imagerie proche infrarouge (Roggo, Gendrin et Spiegel, 2007). .....	18
Figure 7: Spectres moyens de racines de pois et de froment acquis en proche infrarouge (D. Eylenbosch et al., 2018b). .....	20
Figure 8: Evolution de la température et des précipitations pour l'année culturale 2017-2018 à Loncée (Gembloux, Belgique). .....	26
Figure 9: Schéma d'une parcelle (unité expérimentale). .....	27
Figure 10: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois d'hiver" avec ses quatre variétés représentées. ....	27
Figure 11: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois de printemps - Fumure" avec ses quatre fumures représentées. ....	28
Figure 12: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois de printemps - Variété" avec ses trois variétés représentées. ....	29
Figure 13 : Illustration du prélèvement des carottes de sol avec le système racinaire de pois au moyen de tubes en PVC. ....	29
Figure 14: L'échantillonnage au niveau de l'unité expérimentale. ....	30
Figure 15: Illustration d'un système racinaire d'une plante de pois étalée sur un treillis de fine maille (moustiquaire). ....	31
Figure 16: Découpage du système racinaire d'un plant de pois en horizons de 5 cm. ....	32
Figure 17: Caméra line scan hyperspectrale proche infrarouge (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie). ....	33
Figure 18: Prédiction des résidus de culture (paille) grâce aux arbres de classifications dichotomiques des Séparateurs à Vastes Marges (SVM) sur une image hyperspectrale acquise dans le proche infrarouge (NIR). ....	34
Figure 19: Arbre de classification dichotomique basé sur deux modèles SVM et permettant la classification en trois classes spectrales des spectres PIR extraits d'une image hyperspectrale PIR (adapté de Eylenbosch et al., 2016). ....	35
Figure 20: Illustration des nodosités avant d'être séchées, une heure après le séchage par convection à 70°C et à la fin du séchage 24 heures plus tard. ....	37
Figure 21: Illustration des sitones et de leurs larves présentes dans les carottes de sol lors du lavage des systèmes racinaires le 18 mai 2018. ....	39
Figure 22: Représentation des échantillons de nodosités utilisés pour la calibration du modèle de régression PLS. ....	40
Figure 23: Représentation des échantillons de nodosités utilisés pour la validation du modèle de régression PLS. ....	41
Figure 24: Illustration des nodosités séchées par convection et avec ventilation. ....	41
Figure 25: Représentation des spectres moyens dans le proche infrarouge pour les nodosités issues des sous échantillons des deux types de séchages. ....	42
Figure 26: Le pourcentage de nodosités issues des deux types d'échantillons (convection vs. ventilation) qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive par le modèle de régression PLS 2018. ....	43

Figure 27: Illustration de la prédiction de nodosités séchées par ventilation et séchées par convection par le modèle de régression PLS 2018. ....	44
Figure 28: La teneur maximale en Lb d'une nodosité parmi toutes les nodosités présentes dans l'échantillon pour les deux types de séchages : convection et par ventilation.....	44
Figure 29: Représentation de la teneur en Lb moyenne réelle et prédite des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) issue d'un même ensemble de plante pour les deux types de séchages par convection et avec ventilation. ....	45
Figure 30: Représentation de la teneur moyenne en Lb des nodosités de référence, séchées par convection, qui ont été prédites par le modèle régression PLS 2018 et le modèle régression PLS 2017. ....	46
Figure 31: Illustration d'un système racinaire de pois qui a été prédit par les deux modèles de régression PLS 2018 et 2017. ....	47
Figure 32: Représentation de la teneur en Lb moyenne réelle et maximale prédite des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) issue d'un même ensemble de plantes pour les deux types de séchages par convection et avec ventilation. ....	48
Figure 33: L'évolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités présentes sur toute l'image acquise (I), de la teneur minimale en Lb d'une nodosité (II) et la teneur maximale en Lb d'une nodosité au cours du temps (III). ....	50
Figure 34: L'évolution hebdomadaire de la leghémoglobine (Lb) pour le pois d'hiver et le pois de printemps avant ou après la floraison. ....	51
Figure 35: Comparaison de l'évolution hebdomadaire de la teneur en leghémoglobine (Lb) des nodosités du pois de printemps et d'hiver avant et après la floraison. ....	52
Figure 36: Répartition des nodosités sur le système racinaire d'une plante de pois qui a été scannée début mai, une semaine avant le début de floraison de la culture. ....	54
Figure 37: Représentation des variations de teneurs en Lb des nodosités ( $\text{mg g}^{-1}$ ) sur un système racinaire de pois d'hiver provenant de la même parcelle lors de deux dates différentes. ....	55
Figure 38: Evolution de la teneur en leghémoglobine des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) se trouvant sur la racine primaire ou sur les racines latérales dans la culture du pois de printemps. ....	56
Figure 39: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités pour les variétés (Fresnel, Myster et Furious) aux stades 5 feuilles et 7 feuilles. ....	58
Figure 40: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités pour les variétés d'hiver aux stades élongation de la tige principale et en début de floraison. ....	58
Figure 41: Evolution de la teneur maximale en Lb des nodosités pour les trois variétés (Fresnel, Myster et Furious) pour les différentes dates. ....	59
Figure 42: La densité de nodosités par centimètre de racine pour les différentes variétés sur l'entièreté du système racinaire. ....	61
Figure 43: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités de deux types de cultures (pois en association avec du froment et en culture pure) au cours de leur floraison jusqu'à la fin de remplissage des graines. ....	63
Figure 44: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités au cours de leur floraison pour les différentes variétés (Angelus, Safran, Tiberius). ....	67
Figure 45: Poids moyen d'une plante de pois, exprimée en gramme de matière sèche, pour les variétés Angelus, Safran et Tiberius. ....	68
Figure 46: Illustration de deux mesures de pH qui ont été réalisées sur la parcelle "Pois de printemps - fumure" en fin d'expérience. ....	72

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Pourcentage moyen des nodosités séchées par convection qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive au sein des échantillons de référence. ....	47
Tableau 2 : La teneur moyenne en leghémoglobine des nodosités (mg par g de nodosités fraîches) du pois d'hiver et de printemps mesurée à plusieurs semaines d'intervalles avant et après la floraison. ....	52
Tableau 3: Evolution du nombre de nodosités par cm de racine pour les quatre variétés (Fresnel, Myster et Furious) jusqu'à leur floraison. ....	60
Tableau 4: Comparaison de la densité de nodosités par cm de racine pour deux horizons dans le sol. ....	61
Tableau 5: Teneurs maximales prédites en Lb des nodosités pour les deux types de cultures (pois en association & pois pur) pour les différentes dates de prélèvements. ....	64
Tableau 6: Teneurs minimales prédites en Lb des nodosités pour les deux types de cultures (pois en association & pois purs) pour les différentes dates de prélèvements. ....	64
Tableau 7: Teneurs moyennes en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol pour les trois variétés de pois de printemps. ....	66
Tableau 8: Teneurs moyennes en Lb des nodosités des trois variétés (Angelus, Safran et Tiberius) à leur entrée en floraison jusqu'à la fin de leur floraison. ....	67
Tableau 9: Teneurs maximales en Lb des nodosités de trois variétés (Angelus, Safran et Tiberius) à leur entrée en floraison jusqu'à la fin de leur floraison. ....	68
Tableau 10: Teneurs moyennes en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol pour la variété REBEL. Deux mesures ont été réalisées: en début et en fin de floraison. ....	70
Tableau 11: Représentation de la teneur en Lb moyenne des nodosités pour les différentes modalités de fumure et la modalité témoin pour les deux dates de prélèvements. ....	71
Tableau 12: Représentation de la teneur en Lb moyenne des nodosités pour les différentes modalités de fumure et la modalité témoin pour les deux dates de prélèvements. ....	72

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>APPO</b>	Association pour la Promotion des Protéagineux et des Oléagineux
<b>ATP</b>	Adénosine-Triphosphate
<b>CIPAN</b>	Cultures Intermédiaires Piège à Nitrate
<b>Lb</b>	Leghémoglobine, exprimée en mg par gramme de nodosités fraîches
<b>m<sup>2</sup></b>	Mètre carré
<b>N<sub>2</sub></b>	L'azote atmosphérique
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Protoxyde d'azote
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniac
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	L'ion d'ammonium
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	L'ion nitrate
<b>Nodosités "primaires"</b>	Nodosités présentes sur la racine principale de la plante
<b>Nodosités "secondaires"</b>	Nodosités présentes sur les racines latérales de premier ordre de la plante
<b>Nbr</b>	Nombre
<b>NIR</b>	Near-infrared, le proche infrarouge
<b>PIR</b>	Proche Infra-Rouge
<b>Qx</b>	Quintaux
<b>RSME</b>	L'erreur quadratique moyenne
<b>RSMEC</b>	L'erreur quadratique moyenne d'étalonnage ou de calibration
<b>RSMECV</b>	L'erreur quadratique moyenne de validation croisée
<b>RMSEP</b>	L'erreur quadratique moyenne de prédiction
<b>Std</b>	Ecart-type standard
<b>SVM</b>	Support Vector Machine
<b>UE</b>	l'Union Européenne

# I. Introduction

Les défis alimentaires, environnementaux et économiques auxquels l'agriculture doit faire face aujourd'hui sont nombreux et non négligeables. Ces dernières années, l'augmentation de la demande mondiale des besoins alimentaires pour nourrir une population humaine et animale en expansion a poussé l'agriculture à s'intensifier et recourir majoritairement à des engrais de synthèse. Par ailleurs, l'utilisation excessive de ces engrais entraînent des enjeux environnementaux qui sont liés à la pollution des sols, l'augmentation de la concentration du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, l'utilisation de ressources fossiles non renouvelables et la préservation de la qualité de l'écosystème. Ceci oblige donc l'agriculture à relever ces défis en évoluant de façon durable.

A côté de ça, les légumineuses ont la capacité, en symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, à exploiter l'azote atmosphérique présent en grande quantité dans l'atmosphère. L'activité symbiotique fixatrice de l'azote est une source d'azote qui permet à la plante de répondre favorablement aux exigences environnementales. Ces plantes ont la particularité de s'affranchir des engrais azotés de synthèse et d'offrir des reliquats azotés naturels pour les cultures suivantes.

Cependant les légumineuses, qui sont riches en protéines, ne sont pas cultivées en quantités suffisantes en Europe. Elles y représentent seulement 2 % des surfaces cultivées (Schneider *et al.*, 2015). Afin de répondre à ces besoins protéiques, du soja est importé massivement en Europe. Cela implique donc à s'intéresser plus en profondeur aux cultures protéagineuses de nos régions afin de limiter cette dépendance à la culture de soja.

Ce travail vise à évaluer l'activité fixatrice de l'azote de pois protéagineux par imagerie hyperspectrale proche infrarouge. L'objectif est de quantifier la leghémoglobine, une molécule indicatrice de l'activité fixatrice de l'azote, au sein des nodosités de pois protéagineux tout au long de la culture et de comparer l'effet de plusieurs modes de conduite de cette culture.

Afin d'illustrer cela, deux axes de conduites ont été organisés dans ce travail :

- Le premier vise à établir les conditions qui permettent de mesurer par imagerie hyperspectrale la teneur en leghémoglobine au sein de ses nodosités.
- Dans le second axe, la teneur en leghémoglobine a été analysée dans les différentes cultures de pois (en culture pure d'hiver, de printemps et en association) afin de mettre en évidence l'activité fixatrice de l'azote au sein de différentes expériences.

# II. Synthèse Bibliographique

## 1 Le pois protéagineux

### 1.1 La classification

Le pois protéagineux (*Pisum sativum* L.) est une plante annuelle appartenant à la famille des légumineuses (Fabaceae). Il se classe parmi les protéagineux possédant des graines riches en amidon et protéines, mais pauvres en huiles. La composition de ses graines possède des caractéristiques intéressantes et recherchées pour l'alimentation humaine et animale (Carrouée, Crépon et Peyronnet, 2003). Leur composition moyenne (en % de matière sèche) est de :

- 50 % d'amidon ;
- 25 % de protéines ;
- 15 % de fibres ;
- 2 % de matières grasses ;
- 8 % de diverses matières (PROLEA<sup>2</sup>, 2009).

### 1.2 Les problématiques d'emblavement

Depuis une trentaine d'années, l'emblavement de la culture de pois a été influencé en Europe par des choix politiques et une perte de compétitivité en termes de prix et de rendement par rapport à d'autres cultures.

#### 1.2.1 L'histoire

En 1973, l'embargo américain privait l'Europe de sa principale source de protéines : le soja. L'Europe a établi, en réaction à cette mesure, un plan d'aide à la production communautaire de protéines afin de limiter la dépendance européenne vis-à-vis des gros producteurs de soja (USA, Brésil, Argentine). Le résultat amena la culture à son pic de production en 1998 (Coudurier *et al.*, 2013). A partir des années 2000, suite à l'interdiction des farines animales, l'Europe privilégia les importations plutôt que de produire ses propres protéines (Mouillet, 2000). Cette décision s'est traduite par une baisse de soutien financier pour les cultures protéagineuses et donc une dégradation de la compétitivité par rapport aux autres cultures. Par conséquent, à partir de 2003, une baisse des surfaces emblavées a été enregistrée (Figure 1) (Coudurier *et al.*, 2013). Aujourd'hui, au sein des aides octroyées par la PAC pour la période 2015-2020, chaque état membre a la possibilité de maintenir des aides couplées pour certaines productions. Cependant, l'affectation ne peut se faire que dans des proportions limitées pour les protéagineux (Schneider *et al.*, 2015).

---

<sup>2</sup> PROLEA = La filière française des Huiles et Protéines Végétales

## Evolution des surfaces de graines protéagineuses dans l'UE

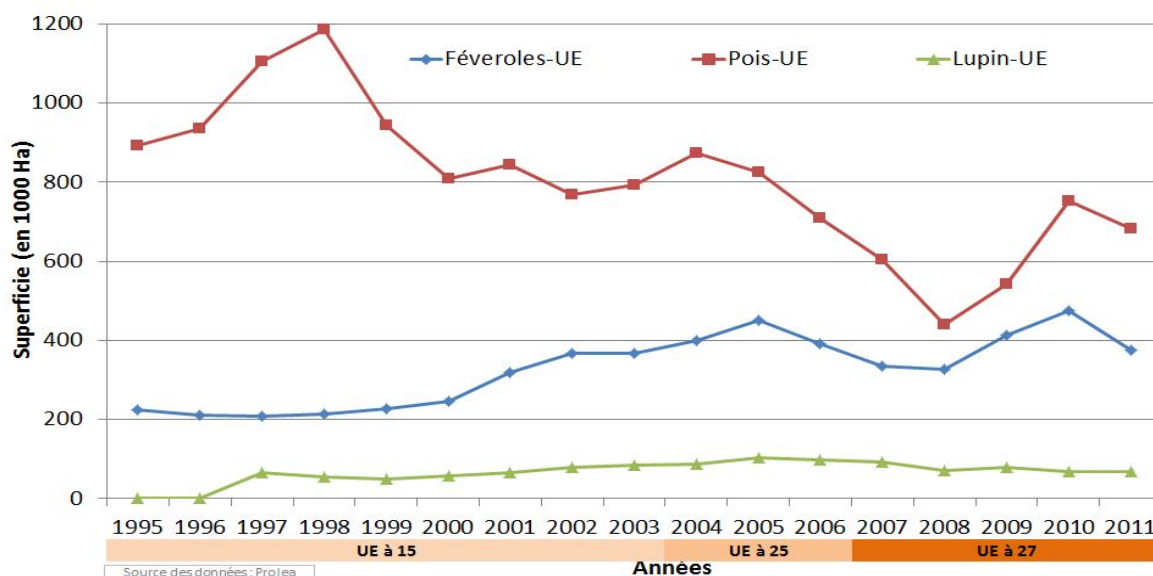


Figure 1: Evolution des surfaces de trois cultures de protéagineux dans l'Union Européenne (UE à 15 jusqu'en 2003, UE à 25 et ensuite à 27) (Prolea, 2009).

### 1.2.2 La concurrence par rapport aux autres cultures

Toutefois, le soja reste à l'heure d'aujourd'hui la légumineuse à graine dominante au niveau de la production mondiale et dans l'alimentation des élevages grâce à sa teneur en protéines plus élevée que les autres protéagineuses. Et cela malgré le fait qu'elle ne permet pas une autosuffisance protéique des exploitations (Carrouée, Crépon et Peyronnet, 2003). De plus, d'autres facteurs comme la trop forte variabilité des rendements, la sensibilité élevée aux bio-agresseurs, ou encore sa faible insertion dans les filières de production actuelles défavorisent l'emblavement de la culture du pois (Voisin et al., 2013).

### 1.3 Le progrès

Depuis les années '80, le progrès génétique a tout de même permis de favoriser le développement du pois.

La création de variétés d'hiver a permis d'allonger le cycle de développement de la culture et d'avancer la date d'apparition de la floraison dans l'année. La floraison ne coïncide dès lors plus avec les fortes températures estivales qui engendrent des coulures de fleurs<sup>3</sup>, responsables d'une perte de rendement.

Un autre problème rencontré avec cette culture est sa faible compétitivité vis-à-vis des adventices. Les causes sont un développement racinaire plutôt lent et une capacité à fixer l'azote qui dépend du réchauffement du sol à la sortie de l'hiver. Certains leviers agronomiques, comme l'augmentation de la densité de semis, permettent de limiter cette compétition entre la culture et les adventices. De plus, la sélection variétale a permis à la

<sup>3</sup> La coulure des fleurs est la chute ou l'avortement des fleurs d'une plante suites à de fortes chaleurs lors de sa floraison.



culture de pois d'être plus compétitive vis-à-vis des adventices en créant des variétés plus précoces et plus hautes. Pour finir, la création de la variété de type « afile », où les folioles ont été remplacées par des vrilles, a permis à l'espèce de mieux résister à la verse et d'être moins sensible aux maladies foliaires grâce à une aération accrue (Couëdel, 2015). Les récoltes sont dès lors plus faciles et de meilleure qualité.

## 1.4 Les débouchés

Aujourd'hui, en Wallonie, que ce soit pour le développement des filières monogastriques différenciées (locales, bio, ...) ou l'alimentation humaine à différents titres, les besoins en graines protéagineuses restent importants. Ce développement de la culture wallonne de pois protéagineux est favorisé par des atouts de proximité, un caractère non OGM et des bénéfices spécifiques environnementaux qui seront décrits plus loin (Pierreux *et al.*, 2014).

Le pois apporte simultanément des protéines, de l'amidon et de la cellulose qui sont valorisés dans différents débouchés :

### 1. L'alimentation animale :

Dans le secteur animal, la qualité du pois n'est aujourd'hui pas un critère important lors de la commercialisation par les agriculteurs. Cependant, afin d'ajuster au mieux les rations, il est important de connaître la qualité des pois en termes de protéines et d'acides aminés essentiels et de l'adapter à son utilisation (Abrams *et al.*, 2016).

Chez les monogastriques, la richesse en lysine (supérieure à celle des oléagineux) et en énergie, fait du pois, en combinaison avec d'autres matières premières complémentaires, une source nutritionnelle particulièrement bien adaptée à l'alimentation des porcs et des volailles (Schneider *et al.*, 2015; Légère, 2011).

Le pois, une source riche en amidon (VEM<sup>4</sup>= 1200), est aussi incorporé dans les rations des ruminants (Abrams *et al.*, 2016).

Outre l'aspect nutritionnel, l'utilisation du pois dans l'alimentation animale a aussi l'avantage de ne pas nécessiter de transformation poussée au préalable (Schneider *et al.*, 2015).

### 2. L'alimentation humaine :

En ce qui concerne l'alimentation humaine, une grande partie des pois jaunes est exportée vers l'Inde pour y remplacer partiellement le pois chiche cultivé localement. A côté de cela, des soupes et autres recettes à base de pois sont remises au goût du jour dans le cadre des aliments-santé (Abrams *et al.*, 2016). La croissance de la demande

---

<sup>4</sup> VEM= Voeder eenheid voor melk, cela correspond au système hollandais d'unité énergétique pour le secteur des productions laitières (1 VEM correspond à la quantité d'énergie nette contenue dans 1 g d'orge) (Cuvelier et Dufasne, 2015)

de produits végétariens positionne le pois comme étant un élément indispensable dans l'alimentation humaine (Munier-Jolain et Carrouée, 2003).

3. Les ingrédients agro-alimentaires :

Le cracking du pois permet de valoriser ses différentes fractions (protéines, amidon, fibres, etc.) dans l'industrie agro-alimentaire. La société Cosucra, situé à Warcoing, procède au cracking pour valoriser la protéine du pois pour le marché des nutriments spécifiques (seniors, sportifs) ou médicales (gestion du poids) (Abrams *et al.*, 2016). Cette entreprise y a récemment doublé sa capacité de production (Sillon Belge, 2018).

4. Le non-alimentaire :

Certains produits non alimentaires, comme étant des matériaux biodégradables à base de protéines et de fibres, pourraient aussi émerger sur le marché dans le futur (Schneider *et al.*, 2015).

## 1.5 La culture

### 1.5.1 La place dans la rotation

Comme toutes les légumineuses, le pois peut être considéré comme un excellent précédent cultural. Son aptitude à fixer l'azote atmosphérique grâce à la symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote permet d'obtenir un produit riche en protéines. De plus, la culture laisse dans le sol des reliquats d'azote variant de 20 à 50 kg/ha (Abrams *et al.*, 2016; Munier-Jolain et Carrouée, 2003).

Le pois protéagineux d'hiver est semé à l'automne, idéalement entre le 20 octobre et le 10 novembre. La densité de semis varie, en fonction du poids de mille grains, entre 120 et 175 kg/ha pour atteindre un peuplement de 80 plants au m<sup>2</sup>. (Abrams *et al.*, 2016).

En termes de fertilisation, la culture ne nécessite pas d'engrais azotés. Ceux-ci induisent un impact défavorable sur le développement des nodosités et favorisent un développement végétatif excessif rendant la culture sensible à la verse. Pour la fumure phospho-potassique, les exportations sont de 1 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et 1,6 kg de K<sub>2</sub>O par 100 kg de graines produites (Abrams *et al.*, 2016). La fertilisation se limite donc à compenser les exportations ou entretenir la fertilisation minérale du sol (Munier-Jolain et Carrouée, 2003).

### 1.5.2 Les facteurs limitants de la culture

Face aux mauvaises herbes, le pois protéagineux est peu concurrentiel. Un traitement herbicide précoce en prélevée, suivi d'un traitement de post-levée si nécessaire, permettent de lutter contre les adventices. Des solutions alternatives au désherbage chimique, comme les désherbages mécaniques, existent (Abrams *et al.*, 2016).

La floraison est la période la plus vulnérable aux maladies fongiques. Les plus fréquentes pour la culture de pois sont le botrytis (*Botrytis cinerea* Pers.) et l'antracnose (*Aschochyta pisi* Lib.,

*Ascochyta pinodella* L.K. Jones, *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Petr.). Si les conditions climatiques le justifient, une protection fongique doit être réalisée de manière à protéger la culture durant la période de floraison. La culture doit aussi faire face actuellement à la progression d'*Aphanomyces euteiches* Drechsler, un champignon du sol pour lequel aucun moyen de lutte efficace n'existe actuellement (Abrás *et al.*, 2016).

Chez les légumineuses, les nodosités sont sensibles aux attaques des sitones (*Sitona lineatus* Linnaeus). Cet insecte est un coléoptère qui appartient à la famille des Curculionidae. Il se reconnaît à ses élytres (ailes rigides) rayés et à son rostre (prolongement rigide de la tête) court. Les adultes engendrent des morsures sur le feuillage et pondent leurs œufs à l'intérieur des nodosités. Les femelles possèdent une très grande fécondité (jusqu'à 900 œufs). Les larves se développent dans les nodosités pendant 2 à 3 semaines en se nourrissant de leur contenu et ensuite de petites racines de la plante. Ils limitent donc la fixation symbiotique de la culture et provoquent une diminution de rendement qui peut aller jusqu'à 10 qx/ha maximum (ARVALIS, 2018; Voisin et Gastal, 2015).

### 1.5.3 Les avantages agronomiques et environnementaux

D'un point de vue agronomique, outre l'effet du précédent cultural qui est décrit ci-dessus, l'intégration de la culture de pois dans la rotation permet de diversifier les espèces cultivées afin de faciliter la gestion des mauvaises herbes et des maladies (Abrás *et al.*, 2016).

D'un point de vue environnemental, le pois est une culture qui permet de réduire certains impacts négatifs liés à l'agriculture sur l'environnement. L'aptitude de la plante de fixer l'azote atmosphérique permet à la culture d'être moins consommatrice en énergie non renouvelable étant donné qu'elle ne nécessite aucun apport d'engrais azoté minéral (Munier-Jolain et Carrouée, 2003). Par conséquent, l'absence d'apport d'engrais minéraux réduit de 70 % les émissions de gaz à effet de serre au niveau du sol, et plus particulièrement en N<sub>2</sub>O, comparé à une culture traditionnelle de froment. Ces émissions résultent principalement de la fabrication et du moment de l'épandage de ces engrais. Deuxièmement, la capacité de la plante à fixer l'azote n'entraîne aucun risque de pollution lié à l'épandage d'engrais d'azotés ou de lixiviations de nitrates pour autant que les reliquats présents initialement dans le sol soient bien valorisés par les racines de la plante (Abrás *et al.*, 2016; Munier-Jolain et Carrouée, 2003). De plus, l'obligation de semer une CIPAN après la récolte d'une légumineuse, comme « interculture courte », permet de limiter les lixiviations des reliquats d'azote de la culture au niveau du sol (Proctecteau, 2016).

## 2 L'architecture racinaire et sa fixation symbiotique

### 2.1 Système végétatif du pois

La plante de pois se caractérise au niveau du système végétatif par une ou plusieurs tiges. Chaque tige est constituée d'une succession d'unités fonctionnelles, appelées phytomères

(Figure 2). Du bas vers le haut de la tige, l'organisation des phytomères est identique, mais d'âges différents. Une croissance indéterminée est donc observée avec un développement simultané des organes végétatifs et reproducteurs (Lecoecur et Turc, 1994).

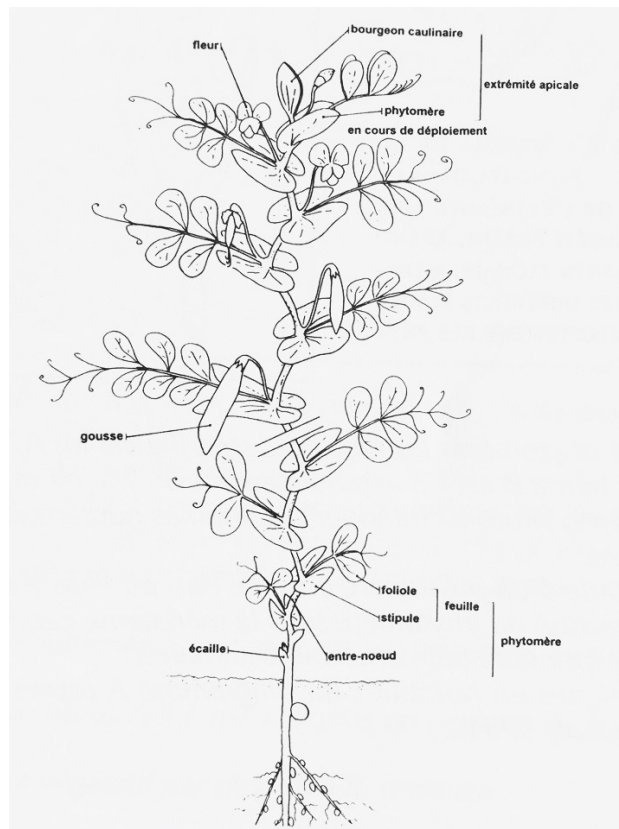


Figure 2: Schéma général d'une plante de pois (Lecoecur et Turc, 1994).

## 2.2 Système racinaire du pois

### 2.2.1 La mise en place du système racinaire

Le système racinaire du pois est de type pivotant. Il est composé d'une racine principale, appelé « pivot », et de racines primaires et secondaires qui apparaissent de manière acropète<sup>5</sup> sur la racine principale (Munier-Jolain *et al.*, 2005).

Selon Munier-Jolain *et al.* (2005), trois phases distinctes permettent de décrire le développement du système racinaire :

#### 1. Elongation de la racine principale :

Lors de la période végétative des parties aériennes, une élévation rapide de la racine principale est observée. La vitesse d'élongation dépend des réserves de la graine. Elle est maximale lors la germination, puis diminue avec l'épuisement des réserves de la graine. De plus, un développement horizontal des racines latérales est aussi initié superficiellement.

<sup>5</sup> Prenant naissance ou se développant dans une série longitudinale à partir de la base vers l'extrémité

2. Augmentation de la biomasse racinaire :

Lors de la floraison jusqu'à la formation des graines, une forte croissance de biomasse racinaire, accompagnée d'un développement des racines latérales, est observée. Une pénétration en profondeur pouvant aller jusqu'à 80 cm permet de répondre aux besoins nutritionnels grandissant de la plante.

3. Ralentissement de l'accumulation de biomasse et émission des dernières latérales :

Cette phase est observée au cours du remplissage des graines. Les avis sont contrastés pour l'arrêt la croissance racinaire. Certains disent que la croissance racinaire s'arrête après la floraison, alors que d'autres ont montré que la biomasse racinaire peut augmenter jusqu'à la maturité physiologique (Mitchell et Russel (1971), Amrstrong et Plate (1994)).

Le facteur principal qui affecte le plus le développement du système racinaire du pois est la qualité de l'état structural du sol. De plus, la présence de nitrates dans le sol affecte aussi localement la prolifération des racines, mais n'a aucune incidence sur le profil de répartition de celles-ci. Le pois conserve un système racinaire qui est superficiel.

## 2.3 Développement des nodosités sur le système racinaire

### 2.3.1 Les plantes et l'azote

L'azote, un élément essentiel pour la croissance des plantes, est prélevé par la plupart des plantes dans le sol sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Un facteur limitant du prélèvement de cet élément est la compétition accrue avec d'autres organismes présents dans le sol (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

Pourtant, l'azote est disponible en grande quantité dans l'atmosphère, sous forme de  $\text{N}_2$  : il le compose à 78 %, en volume. Malgré son abondance, la plupart des plantes sont incapables d'utiliser l'azote sous cette forme. Cependant, les légumineuses via l'association avec des bactéries procaryotes sont capables de fixer cet azote. L'association symbiotique entre ces deux organismes permet de catalyser l'azote en ammoniac et de le rendre disponible pour la plante grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase. Seules certaines bactéries possèdent ce complexe (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003). Et, en contrepartie, la plante fournit les éléments carbonés nécessaires, issus de la photosynthèse, aux bactéries qui permettent de remplir leurs besoins (Munier-Jolain *et al.*, 2005).

Dans le cas du pois, le procaryote est un rhizobium (*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*). Cette souche bactérienne est capable d'interagir en symbiose avec plusieurs genres différents de plantes (Voisin, Cellier et Jeuffoy, 2015).

L'association symbiotique provoque sur les racines de la plante hôte l'apparition d'excroissances racinaires spécifiques, appelées « nodosités », qui hébergent ces bactéries symbiotiques (Voisin, Cellier et Jeuffoy, 2015).

### 2.3.2 La formation des nodosités

La fixation symbiotique et la formation des nodosités mises en place entre la bactérie et les racines hôtes impliquent des interactions anatomiques, morphologiques et biochimiques qui peuvent être différenciées en quatre stades principaux (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003) :

1. La multiplication des rhizobiums, la colonisation de la rhizosphère, la fixation aux cellules épidermiques et aux poils absorbants de la plante ;
2. L'invasion des bactéries et la formation d'un cordon d'infection ;
3. L'initiation d'une nodosité et son développement dans le cortex de la racine ;
4. Le déversement des bactéries du cordon d'infection et différenciation de cellules spécialisées dans la fixation de l'azote ;

#### 1. Stade de pré-infection :

Les stades de pré-infection commencent avant même que la plante hôte et le rhizobium, déjà présent dans le sol, se reconnaissent d'un point de vue cellulaire (Hirsch, 1992). L'établissement de la symbiose requiert un échange de signaux (Taiz *et al.*, 2014).

La première étape implique un chimiotactisme<sup>6</sup> positif des racines de la plante hôte vers les bactéries. La production de composés chimiques attractifs par les racines (flavonoïdes et homosérine dans le cas du pois) permet d'attirer les bactéries près des racines pour y induire la synthèse de la protéine rhizobiale nod D, qui est impliquée dans la régulation de la transcription des autres gènes nod (Taiz *et al.*, 2014; Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

Ces gènes nod codent pour des protéines qui sont impliqués dans la synthèse de facteurs de nodulations appelés « facteurs nod ». Ceux-ci induisent de nombreux changements de croissance et de métabolisme chez les racines de l'hôte pour y favoriser l'installation des bactéries. On y observe une production accrue de poils absorbants et le développement de racines plus courtes et plus épaisses. De plus, ces facteurs de nodulations stimulent aussi la division des cellules du cortex, qui forment le méristème primaire du nodule. Enfin ceux-ci sont aussi responsables de la reconnaissance entre le rhizobium et l'hôte grâce à l'interaction spécifique qui existe entre les lectines de l'hôte et les polysaccharides de surface du symbionte (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

---

<sup>6</sup> Effet d'attraction ou de répulsion qu'exerce une substance chimique sur une cellule vivante

## 2. L'invasion du poil absorbant et du cordon d'infection et l'initiation du nodule :

Ensuite, une invagination en forme de tube se forme sur les poils absorbants. Elle est appelée cordon d'infection et y enferme les bactéries (Figure 3). L'allongement de ce cordon est assuré par l'approvisionnement en matériaux membranaires véhiculés par des vésicules golgiennes (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

Simultanément, plus bas dans le cortex de la racine, des cellules corticales se différencient et se divisent pour former une aire distincte dans le cortex, appelé nodule primaire. D'autres composés, comme l'auxine, les cytokinines, l'éthylène, etc., influencent positivement ou négativement la formation des nodosités (Taiz *et al.*, 2014).

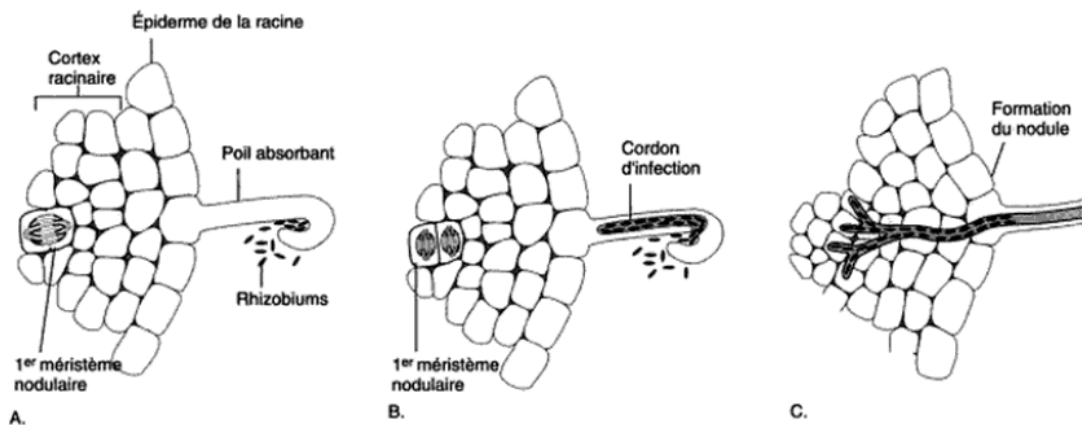


Figure 3: Schéma du mécanisme d'infection qui provoque la formation d'une nodosité. L'invagination en forme de tubes des poils absorbants (A) enferme les bactéries dans le cordon d'infection (B) pour migrer dans le cortex. Là, le cordon d'infection se ramifie pour infecter plusieurs cellules de la plante hôte (C), qui formeront la nodosité (Hopkins, 2003).

## 3. La ramification du cordon d'infection et la libération des bactéries :

Une fois que le cordon d'infection arrive en bas du poil absorbant, celui-ci fusionne avec le plasmalemme pour progresser à travers l'espace apoplastique des cellules corticales vers le nodule primaire. Là, il s'y ramifie afin d'infecter plusieurs cellules et déverser les bactéries, entourées d'une membrane plasmique, dans le cytoplasme des cellules. Une fois déversées, elles continuent à se diviser pour augmenter en volume. Par la suite, elles se différencient en bactéroïdes fixant l'azote et elles établissent des connexions vasculaires avec le système vasculaire de la racine pour faciliter les échanges d'azote fixé et de carbone issus de la photosynthèse (Taiz *et al.*, 2014; Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

### 2.3.3 Morphologie et distribution spatiale des nodosités

Dans le cas du pois, les nodosités sont de type indéterminé. Ce type leur donne une forme allongée et cylindrique. Les nodosités sont caractérisées par un méristème nodulaire persistant où l'activité méristématique se maintient. Ceci engendre un gradient de différenciation entre le méristème nodal distal<sup>7</sup> et les tissus attachés à la racine parentale. En

<sup>7</sup> Une zone distale, ou un point distal, qualifie l'extrémité d'un organe opposée à sa zone ou point de fixation.

commençant par son extrémité, la nodosité se différencie en plusieurs zones d'âges différentes: une zone méristématique, une zone d'infection, une interzone, où l'activité symbiotique fixatrice de l'azote a lieu, et enfin, une zone de sénescence (Figure 4) (Voisin et Gastal, 2015; Dupont *et al.*, 2012; Hirsch, 1992).

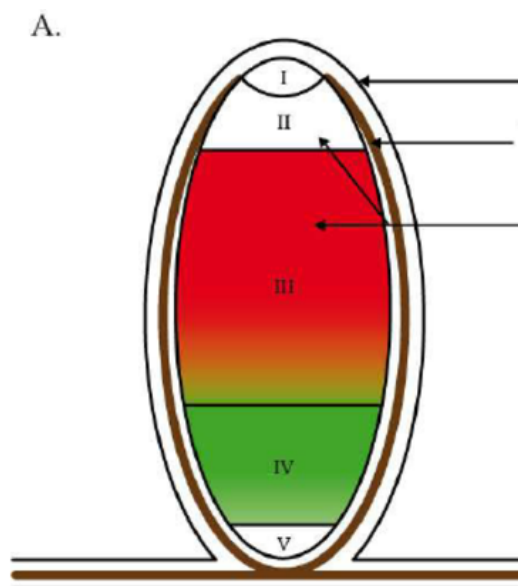


Figure 4: Représentation schématique d'une nodosité indéterminée : I, la zone méristématique; II, la zone d'infection; III, la zone fixatrice de l'azote ; IV, la zone de sénescence et V, la zone d'échange avec la plante (Dupont *et al.*, 2012).

Les nodosités apparaissent sur les racines de manière échelonnée dans le temps. Leur distribution sur les racines est irrégulière et non strictement acropétale<sup>8</sup>. Cette apparition irrégulière des nodosités peut être due soit à une séquence d'infections non strictement acropétales, soit à de légères variations dans le délai entre les infections et l'apparition de nodosités macroscopiques (Tricot, Crozat et Pellerin, 1997).

Selon Munier-Jolain *et al.*, (2005), la densité des nodosités est maximale sur la partie supérieure du système racinaire et diminue vers la zone apicale de la racine. La proportion des racines latérales portant des nodosités est maximale à la base du pivot (90 à 70 %), puis décroît rapidement à mesure qu'on s'en éloigne.

#### 2.3.4 Distribution dans le temps de la fixation symbiotique des nodosités

La capacité des plantes à fixer l'azote peut être caractérisée par différents paramètres structuraux (nombre de nodosités et leur biomasse) et fonctionnels (l'activité spécifique pour la fixation de N<sub>2</sub>).

Selon Naudin *et al.* (2011), le nombre de nodosités et leur biomasse augmentent durant la période végétative jusqu'à la mi-floraison, pour ensuite rester constants. Le nombre de

<sup>8</sup> Prenant naissance ou se développant dans une série longitudinale à partir de la base vers le sommet



nodosités qui apparaissent sur la racine de la plante est proportionnel aux besoins azotés de la plante durant sa croissance (Voisin, Cellier et Jeuffoy, 2015).

En ce qui concerne l'activité spécifique des nodosités, définie comme la quantité de  $N_2$  fixée par unité de biomasse par jour, celle-ci diminue au cours du cycle du pois (Naudin *et al.*, 2011).

Selon Voisin et Gastal (2015) et Voisin, Cellier et Jeuffoy (2015), la dynamique de fixation symbiotique au cours du cycle de la plante peut être résumée en trois étapes :

1. Début de culture :

Aucune fixation symbiotique n'a lieu en début de culture. Les besoins en azote de la plante sont assurés par les réserves de la graine.

2. La levée :

Après l'émergence de la plantule, les nitrates présents dans le sol permettent de subvenir aux besoins de la plante afin de faciliter le démarrage de la croissance et la mise en place des nodosités. 235 degrés-jours après le semis du pois, la fixation symbiotique démarre et prend le relais. Cependant, des niveaux trop importants d'azote minéral (>50 kg/ha) dans le sol retardent la mise en place des nodosités et donc la fixation de  $N_2$ . Ce processus biologique est étroitement régulé par la plante en fonction des niveaux d'azote présents dans le sol.

Ensuite, la fixation symbiotique de l'azote augmente durant la croissance végétative pour devenir majoritaire à la floraison. Il est à noter que la légumineuse garde toutefois la capacité de prélever l'azote du sol en fonction des disponibilités du sol et des besoins de la plante.

3. Remplissage des graines :

A partir du début du remplissage des graines, la fixation symbiotique décroît. Une compétition s'exerce pour les éléments carbonés aux niveaux des graines lors du remplissage. La conséquence est une diminution de la fixation de l'azote qui s'accompagne d'une baisse d'efficacité due au vieillissement des nodosités. En conditions environnementales défavorables, la diminution de la fixation de  $N_2$  est accélérée.

## 2.4 Fixation de l'azote

### 2.4.1 Biochimie de la fixation d'azote

Le diazote ( $N_2$ ), possédant une triple liaison entre ses deux atomes, ne peut être converti qu'à partir d'espèces procaryotes qui possèdent le gène codant pour le complexe enzymatique de la nitrogénase. Cette enzyme, capable de réduire  $N_2$  en  $NH_3$ , est séparée en deux composantes de taille différente : la protéine Fe et la protéine MoFe (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

Dans la réaction de réduction de  $N_2$ , la ferrédoxine, un transporteur protéique d'électron, sert de donneur d'électron à la protéine Fe. À son tour elle hydrolyse l'ATP et réduit la protéine MoFe. Pour finir, cette dernière protéine réduit  $N_2$  en  $NH_3$  (Figure 5). La réduction biologique de cette molécule est coûteuse en énergie (Taiz *et al.*, 2014).

La réaction globale est :

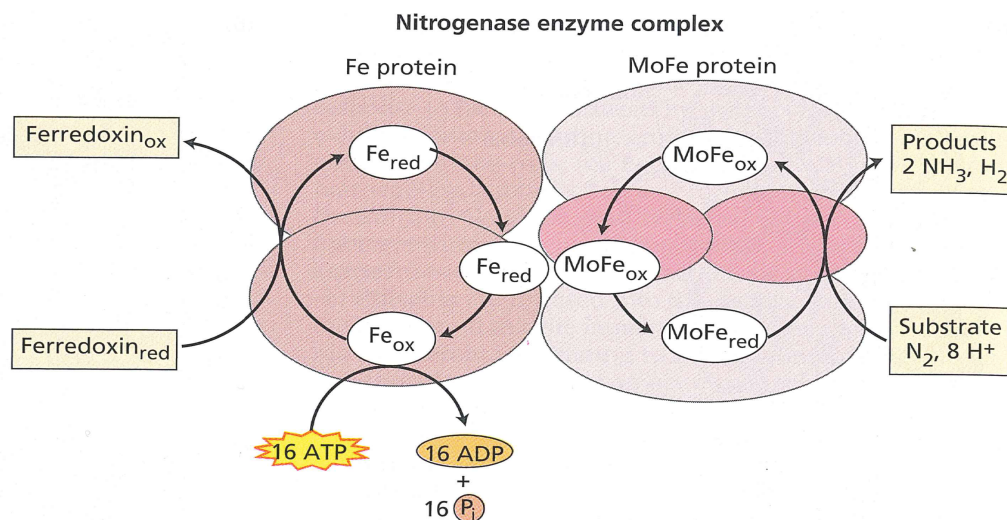
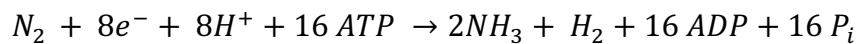


Figure 5: La réaction catalytique de la nitrogénase. (Taiz *et al.*, 2014)

#### 2.4.2 L'assimilation et l'exportation de l'azote fixé

A l'issue de la fixation symbiotique de  $N_2$ , de l'ammoniac est libéré. Celui-ci doit être converti sous une forme organique avant d'être exporté hors des nodosités afin d'éviter une toxicité pour la plante. L'ammoniac est souvent protoné sous forme d'ions d'ammonium, avant d'être assimilé en glutamine ou asparagine à l'extérieur de la membrane péribactéroïdienne. L'étape finale de la fixation de l'azote est l'exportation de l'azote fixé dans les nodosités vers les autres parties de la plante hôte par le xylème sous la forme d'acides aminés dans le cas des pois (Taiz *et al.*, 2014; Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

#### 2.4.3 Nitrogénase et l'oxygène

La nitrogénase est une enzyme sensible à l'oxygène. Les protéines qui la composent sont vite inactivées en cas d'exposition à l'oxygène. Dans le cas des légumineuses, l'oxygène est régulé dans les nodosités par la leghémoglobine, une protéine hème qui lie l'oxygène. Celle-ci est synthétisée par la plante hôte et localisée dans les cellules hôtes infectées par les bactéroïdes. Sa fonction est de contrôler la libération d'oxygène pour permettre la respiration des bactéroïdes et la production d'énergie (ATP, réducteurs), tout en n'entravant pas l'activité de la nitrogénase (Taiz *et al.*, 2014; Hopkins, Rambour et Evrard, 2003).

## 2.5 Leghémoglobine

### 2.5.1 Structure et fonction

La leghémoglobine est une hémoprotéine présente dans les nodosités. Elle est assemblée dans les cellules infectées de la plante hôte (Appleby, 1984) et leur donne une couleur rosâtre. Cette protéine est structurellement et fonctionnellement semblable à l'hémoglobine du sang des mammifères puisqu'elle lie l'oxygène et contrôle sa libération dans la région contenant les bactéroïdes (Hopkins, Rambour et Evrard, 2003). Elle joue un rôle crucial dans la fixation symbiotique de  $N_2$  en ayant une grande affinité pour l'oxygène. Si l'oxygène n'était pas fixé par la leghémoglobine, il inactiverait par oxydation le complexe enzymatique de la nitrogénase. Le rôle de la leghémoglobine est donc de maintenir la concentration d' $O_2$  dans une plage optimale afin d'éviter l'oxydation du complexe enzymatique de la nitrogénase tout en fournissant de l'oxygène pour la respiration bactérienne nécessaire à la production d'ATP (Taiz *et al.*, 2014).

### 2.5.2 Relation entre Leghémoglobine et l'azote fixé symbiotiquement

Au vu du rôle de la leghémoglobine dans les nodosités, il a été démontré qu'une réduction de la concentration en leghémoglobine dans les nodosités mène à une baisse de l'activité de la nitrogénase. L'incapacité dans ces cas-là de la leghémoglobine à fournir de hauts taux d'oxygène pour la respiration des bactéroïdes en serait la cause (Appleby (1984) cité par (Dakora (1995))). De plus, une diminution de la concentration en leghémoglobine dans les nodosités diminue aussi l'activité de la nitrogénase. Celle-ci est inhibée et rendue inactive en présence d'un excès d'oxygène (Scherer *et al.*, 2008).

En présence de hautes teneurs en leghémoglobine dans les nodosités, l'activité de la nitrogénase est maintenue à un niveau constant. Ceci démontre donc qu'une relation fonctionnelle existe entre les protéines de la leghémoglobine et de la nitrogénase dans la fixation symbiotique de  $N_2$  (Dakora, 1995).

Dans d'autres cultures (soja, niébé), des corrélations ont aussi été trouvées entre le contenu en leghémoglobine des nodosités et les taux de réduction de l'acétylène, qui fournit une mesure quantitative de l'activité de fixation de  $N_2$  (Dakora, 1995; Johnson et Hume, 1973).

La concentration en leghémoglobine dans les nodosités est étroitement corrélée avec la quantité d'azote fixée, issue de l'association symbiotique entre la plante et la bactérie (Wilson et Reisenauer, 1963). La leghémoglobine peut donc servir de molécule indicatrice de l'activité fixatrice de l'azote au sein des nodosités de pois.

## 3 La culture associée des céréales et légumineuses

### 3.1 Introduction

Les cultures associées de céréales et légumineuses, qui étaient beaucoup plus pratiquées par le passé en Wallonie, semblent avoir disparu petit à petit aujourd'hui. Seul l'agriculture biologique, qui n'a pas accès aux engrais de synthèse, y retrouve un regain d'intérêt depuis la fin du 20<sup>ième</sup> siècle en profitant de l'azote atmosphérique fixé au niveau des racines de pois (Pierreux *et al.*, 2014).

Pourtant l'intérêt pour ce type de culture devrait revoir le jour. Les défis actuels, auxquels l'agriculture de demain devra faire face, pourraient être un élément déclencheur pour relancer ce type de culture.

Premièrement, une prise de conscience des dégâts environnementaux engendrés par les (mono)cultures intensives a vu le jour (Lithourgidis *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation de ressources non renouvelables de plus en plus chères et la perte de biodiversité y sont pointées du doigt (Malézieux *et al.*, 2009).

Deuxièmement, comme cité plus haut, les besoins augmentant en protéines pour la population humaine et animale obligent les pays à se prémunir contre l'importation du soja. Des programmes d'amélioration ont ainsi émergé. Ils visent à améliorer le rendement en protéines des grains tout en assurant une production stable, au moins équivalente à celle produite par l'une des deux cultures pures (Pierreux *et al.*, 2014).

### 3.2 Avantages et inconvénients des cultures en association

Dans le cas d'une association entre céréales et légumineuses, plusieurs avantages mettent cette pratique culturale en avant :

1. Un rendement globalement plus stable et plus élevé.

Comparé au rendement d'une culture seule, le rendement d'une culture en association génère des rendements plus stables en atteignant des niveaux semblables ou plus élevés (Pierreux *et al.*, 2014; Lithourgidis *et al.*, 2011; Bousseau, 2009). Le Land Equivalent Ratio (LER)<sup>9</sup> a permis de mettre en évidence l'efficacité de la culture cultivée en association comparé à une culture pure en atteignant une valeur supérieure à 1 dans des régions plus chaudes comme la Grèce et le Sud-Ouest de la France, selon Lithourgidis *et al.* (2011) et Justes, Bedoussac et Prieur (2009).

---

<sup>9</sup> Le Land Equivalent Ratio (LER) est défini comme la superficie relative requise pour les cultures pures à produire les mêmes rendements que les cultures intercalaires.

2. Une meilleure résistance à la verse.  
Les essais menés sur la culture en association du froment et du pois d'hiver ont montré une aptitude plus importante des cultures en association à résister à la verse grâce à l'effet tuteur du froment (Couëdel, 2015; Pierreux *et al.*, 2014).
3. Une meilleure qualité de grain du froment.  
Une augmentation de la teneur de protéines des graines de froment d'hiver est observée dans la culture associée comparée à une culture pure. Selon Justes, Bedoussac et Prieur (2009), la compétition interspécifique et la meilleure valorisation de l'azote minérale disponible pour la céréale en seraient les principales causes.
4. Une meilleure conservation des sols et un meilleur contrôle des adventices et des maladies (Lithourgidis *et al.*, 2011; Šarūnaitė, Deveikytė and Kadžiulienė, 2010; Malézieux *et al.*, 2009).

A côté des avantages, certains inconvénients freinent l'emblavement des cultures en association :

1. Une protection des cultures difficiles :  
Peu de produits phytosanitaires sont agréés pour les céréales et les légumineuses en association. Cependant un choix raisonné des variétés permet de maintenir les adventices à un seuil de nuisibilité raisonnable grâce à la compétition interspécifique et au développement rapide de leur couvert végétal (Pierreux *et al.*, 2014).
2. Un choix approprié de variétés (résistance à la verse, hauteur de la végétation, maturité synchronisée) et un respect de certaines règles phytotechniques (densité de semis, fumure adaptées, ...) sont nécessaires à la bonne gestion de la culture (Pierreux *et al.*, 2014).
3. Un coût supplémentaire en triage des graines issues des cultures en association limite le gain net pour l'agriculteur par rapport aux cultures pures (Bousseau, 2009).

### 3.3 La nutrition azotée de l'association des céréales et des légumineuses

Dans les relations interspécifiques, les différentes espèces sont confrontées à une compétition pour les différentes ressources du milieu (eau, azote, lumière). Dans le cas de l'association des céréales avec les légumineuses, les deux espèces sont complémentaires d'un point de vue de l'utilisation des différentes sources d'azote (Voisin and Gastal, 2015 ; Justes, Bedoussac et Prieur, 2009).

La céréale possède une forte compétitivité pour l'azote minérale en début de cycle grâce à un enracinement plus dense et une installation plus rapide que celle de la légumineuse. Cette

phase de compétition rapide, qui est due aux fortes vitesses de croissance en début de cycle de la céréale, oblige la légumineuse à stimuler la fixation symbiotique de l'azote afin de répondre à ses besoins. Par conséquent, cette compétition se transforme en une complémentarité de l'azote. Cela signifie que l'essentiel de l'azote minéral est disponible pour le blé et que la légumineuse utilise essentiellement l'azote atmosphérique fixé au niveau de ses nodosités (Voisin and Gastal, 2015).

Selon Voisin et Gastal (2015), les transferts directs d'azote entre la légumineuse et la céréale semblent être minimes. Cependant, la teneur en protéines de la céréale en association avec une légumineuse est souvent plus importante qu'en culture pure. Ces gains de qualité de rendement sont principalement dus à la complémentarité de l'azote dans l'espace et le temps (Naudin, 2010). De plus, une diminution de la fixation symbiotique dans les nodosités de pois est observée lors du remplissage des graines de pois et de la céréale (Naudin, 2010). Celle-ci pourrait être une source de transfert de l'azote dans les cultures en association des céréales et des légumineuses.

## 4 L'imagerie hyperspectrale proche infrarouge

### 4.1 Introduction

L'imagerie hyperspectrale proche infrarouge (NIR-HSI) est une technique spectroscopique, qui résulte de la combinaison de la spectroscopie proche infrarouge et de l'imagerie. Elle permet d'identifier, de discriminer et/ou de quantifier différents composés au sein d'un échantillon (Dale *et al.*, 2013; Roggo, Gendrin and Spiegel, 2007).

La spectroscopie proche infrarouge classique utilise la région proche infrarouge (700 à 2500 nm) dans le spectre électromagnétique. Elle permet d'obtenir la signature spectrale proche infrarouge moyenne d'un échantillon, qui est caractérisé par sa composition chimique (Dale *et al.*, 2013; Williams, 2009).

L'imagerie hyperspectrale proche infrarouge repose sur l'imagerie et la spectroscopie infrarouge classique. Elle capture de l'information spectrale pour de nombreuses longueurs d'onde dans la région proche infrarouge (PIR) (Williams, 2009). De plus, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge fournit aussi de l'information spatiale sur les images acquises (Dale *et al.*, 2013). Ainsi, une dimension spectrale ( $\lambda$ ) et deux dimensions spatiales ( $x$  et  $y$ ), représentant la distribution des absorbances, forment un hypercube tridimensionnel (Figure 6) qui illustre simultanément les données spectrales et spatiales acquises lors d'un échantillon (Roggo, Gendrin et Spiegel, 2007).

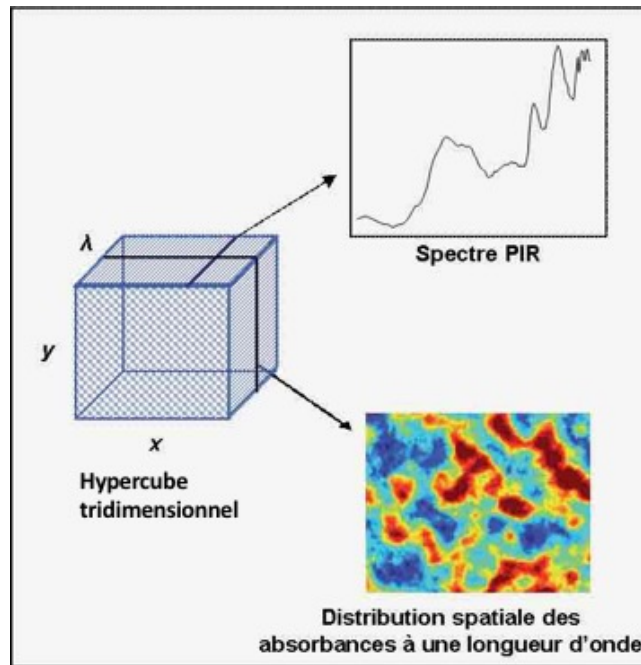


Figure 6: Schématisation du cube de données (hypercube) acquis par imagerie proche infrarouge (Roggo, Gendrin et Spiegel, 2007).

L'extraction de l'information pertinente issue de centaines ou de milliers de spectres acquis est rendue possible grâce aux outils de la chimiométrie. C'est une discipline qui utilise les mathématiques et les statistiques, au sein d'algorithmes, afin de sélectionner l'information pertinente du contenu spectral et de permettre ensuite une catégorisation ou une quantification des composés analysés spatialement (Fernández Pierna *et al.*, 2012; Williams, 2009).

## 4.2 Son utilisation et ses avantages

L'utilisation de cette technologie d'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a déjà prouvé son efficacité dans plusieurs domaines (l'agriculture, les industries alimentaires, pharmaceutiques, chimiques, etc.) (Roggo, Gendrin and Spiegel, 2007). Dans l'agro-alimentaire, par exemple, cette technique est utilisée pour le contrôle de la composition, de la qualité et de la sécurité des denrées alimentaires ou agricoles (Dale *et al.*, 2013; Fernández Pierna *et al.*, 2012).

Dans le passé, des approches via la spectroscopie ont déjà été utilisées à plusieurs reprises pour l'étude de systèmes racinaires. Elle a permis d'identifier et discriminer des racines de taxons différents (Naumann, Heine et Rauber, 2010) ou même de quantifier des proportions de biomasses racinaires au sein d'un échantillon de sol (Kusumo *et al.*, 2011).

Dans l'étude des systèmes racinaires, il est important de trier les échantillons de racine, avant de pouvoir les analyser ou quantifier. Cette étape est considérée comme étant la plus limitante dans la préparation des échantillons avant l'acquisition des données (Majdi, 1996). Les carottes de sols récoltées doivent être lavées avant d'être triées et séparées des différents

éléments qui la composent (résidus de culture, cailloux, racines d'adventices, etc.). Cette étape de tri est souvent réalisée manuellement sur base de critères morphologiques ou sur base de l'utilisation de colorants, isotopes ou d'analyses ADN. Elle est pénible, chronophage et sujette à l'habileté de la subjectivité de l'opérateur (D. Eylenbosch *et al.*, 2018b).

Aujourd'hui l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge offre la possibilité, grâce aux modèles chimiométriques, d'identifier, discriminer et quantifier les différents éléments qui composent chaque échantillon sans devoir les trier manuellement. Elle permet donc de faciliter et réduire le temps de triage d'un échantillon de sol (Dale *et al.*, 2012; D. Eylenbosch *et al.*, 2018b). Deuxièmement, la séparation de plusieurs systèmes racinaires d'espèces différentes n'est plus sujette à la subjectivité visuelle de l'opérateur. Elle permet de discriminer des composés simultanément tout en les classant de façon plus précise (Fernández Pierna *et al.*, 2012; D. Eylenbosch *et al.*, 2018b). Enfin, le triage n'est plus sujet à l'utilisation de réactifs polluants pour l'identification de composés racinaires (Dale *et al.*, 2012; D. Eylenbosch *et al.*, 2018b).

Cependant, l'imagerie hyperspectrale possède aussi ses limites. Le recouvrement des échantillons induit un biais dans la quantification des images hyperspectrales acquises dans un plan bidimensionnel. De plus, les spectres des échantillons racinaires acquis par l'imagerie hyperspectrale ne sont pas toujours correctement prédits dans la classe spectrale dont ils appartiennent. Cette confusion induit un second biais dans la quantification et l'identification des éléments de l'échantillon (D. Eylenbosch *et al.*, 2018b).

### 4.3 Détection, discrimination des nodosités et des racines

L'étude menée par D. Eylenbosch *et al.* (2018b) dans l'association céréales-légumineuses a permis d'acquérir, au moyen d'imagerie hyperspectrale, des spectres moyens pour les différentes composantes présentes dans le sol (racines de pois et de froment, résidus de culture de froment et nodosités). Ceux-ci se discriminent parfaitement dans le proche infrarouge (Figure 7) et ont servi pour la calibration des modèles de discrimination. Dans le cas de la discrimination des nodosités, celle-ci fut excellente en présence de racines de pois et froment. Les nodosités peuvent donc correctement être identifiées sur le système racinaire de la plante de pois.



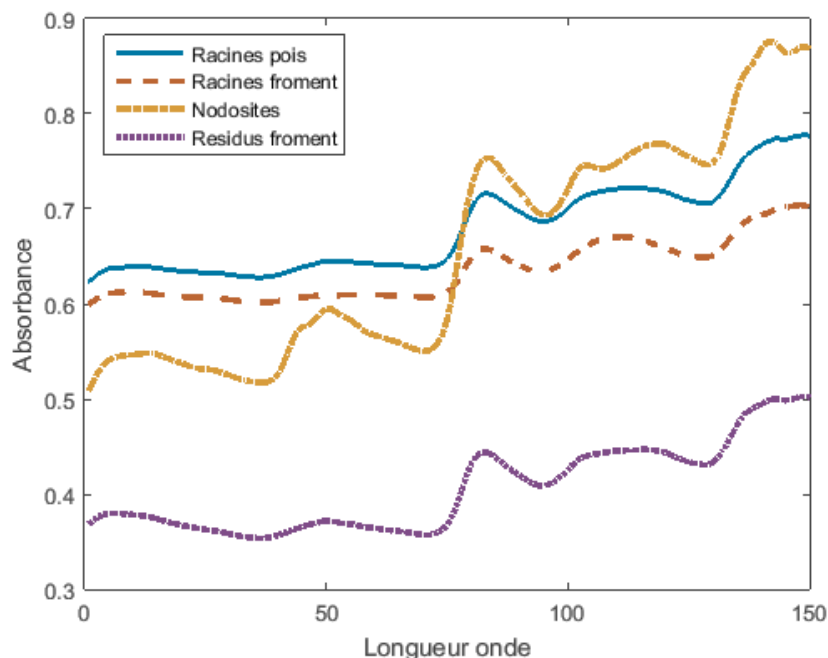


Figure 7: Spectres moyens de racines de pois et de froment acquis en proche infrarouge. Les valeurs d'absorbance sont exprimées pour 150 longueurs d'ondes comprises entre 1432 et 2368 nm (D. Eylebosch *et al.*, 2018b).

Une fois les différentes composantes identifiées et discriminées par les modèles de discrimination, il est rendu possible de quantifier les pixels (unités spatiales) acquis par imagerie hyperspectrale.

Dans le cas de racines, chaque pixel (ou unité spatiale) prédit comme étant une racine, peut donc être converti en masse au moyen d'équations calibrées préalablement. Une relation linéaire existe entre le nombre de pixels étant acquis comme racine et la masse réelle des racines présentes au sein d'un échantillon. (D. Eylebosch *et al.*, 2018b).

Dans les nodosités, il est aussi possible d'y prédire, sur base de l'imagerie hyperspectrale, le contenu en leghémoglobine, un indicateur de la fixation symbiotique de l'azote. Les absorbances spectrales de quelques longueurs d'ondes semblent se distinguer des autres dans la proche infrarouge et permettent de prédire la concentration en leghémoglobine pour chaque pixel (ou unité spatiale) étant classé comme nodosité (D. Eylebosch *et al.*, 2018a).

Cependant l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge est une méthode indirecte. Cela implique qu'une calibration des modèles est nécessaire afin de pouvoir réaliser des analyses qualitatives ou quantitatives (D. Eylebosch *et al.*, 2018b; Dale *et al.*, 2013). La chimiométrie est un outil qui vise à extraire l'information pertinente des mesures physico-chimiques effectuées par l'imagerie hyperspectrale. Elle permet la construction de modèle de discrimination et de calibration grâce à l'aide d'outils statistiques et mathématiques (Dale *et al.*, 2012).

## 4.4 Propriétés spectrales de la leghémoglobine et sa quantification

Les propriétés spectrales de la leghémoglobine et de ses dérivés ne sont pas sensiblement différentes de celles de l'hémoglobine des mammifères. Structuellement et chimiquement la leghémoglobine est semblable à l'hémoglobine du sang tant au niveau de son poids moléculaire qu'au niveau de sa teneur en fer. Ces similitudes permettent de quantifier chimiquement la teneur en leghémoglobine présente dans les nodosités grâce à la conversion de la leghémoglobine en cyanméthémoglobine sous l'action de cyanures (réactif de Drabkin). (Wilson et Reaisenauer, 1962).

Le réactif de Drabkin transforme initialement toutes les formes d'hémoglobines en cyanméthémoglobine, qui va absorber la lumière à une longueur d'onde unique (540 nm). L'intensité de la coloration de la cyanméthémoglobine mesurée par spectrophotométrie à 540 nm est directement proportionnelle à la concentration totale en hémoglobine, ce qui permet de la quantifier (Sigma-Aldrich, 2015).

La quantification chimique de la leghémoglobine dans les nodosités est nécessaire pour la calibration du modèle de régression établi entre les teneurs en leghémoglobine présents dans les nodosités et leurs spectres NIR correspondant. Ce modèle permettra de prédire la concentration de leghémoglobine de chaque pixel (ou unité spatiale), étant prédit comme une nodosité.

La spectroscopie permet aussi d'identifier dans le spectre visible différentes longueurs d'ondes caractéristiques de la leghémoglobine active, sous leur forme ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et de la leghémoglobine inactive, sous leur forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Becana et Moran (1994) ont réussi à quantifier sur base de la spectrophotométrie la proportion de leghémoglobine oxygénée ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dans les nodules. Cette proportion dépend de l'espèce et l'âge des nodosités. Ils ont mis en évidence la présence de leghémoglobine sous forme inactive ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les nodosités en sénescence et une absence de cette forme inactive de Lb dans les jeunes nodosités.

## 5 L'impact génétique sur la fixation symbiotique

### 5.1 Variabilité intraspécifique

Si des variabilités génétiques importantes ont été identifiées entre différentes espèces pour la capacité à fixer l'azote atmosphérique (Herridge *et al.* (2008) cité par Voisin et Gastal (2015)), il n'en est moins pour les génotypes issus d'une même espèce. Aujourd'hui, peu de connaissances existent sur cette variabilité génétique intraspécifique. La limite semble être la capacité à mesurer ce caractère de fixation de l'azote (Voisin et Gastal, 2015)).

Quelques études plus fines ont tout de même pu identifier chez le pois différentes zones génomiques liées au caractère de la nodulation (Bourion *et al.* (2010) cité par Voisin et Gastal

(2015)) et mettre en évidence une bonne héritabilité des gènes à fixer l'azote, souvent corrélée de façon positive avec le rendement (Duc et al. (1987) cité par Voisin et Gastal (2015), Hobbs et Mahon (1982) cité par Voisin et Gastal (2015)).

Le peu d'effort réalisé dans le passé en sélection variétale et les difficultés méthodologiques en champs pour la mesure de la fixation symbiotique sont responsables aujourd'hui de la faible variabilité intraspécifique de cette fixation de l'azote qui existe dans les espèces cultivées (Herridge et Rose (2000) cité par Voisin et Gastal (2015)). Cependant, différents outils de phénotypage ont vu le jour et pourraient à l'avenir permettre une sélection plus directe afin de contribuer à la stabilité des performances agronomiques des légumineuses (Voisin et Gastal, 2015).

Il est à noter qu'une attention particulière doit être portée dans la sélection de manière à garantir l'équilibre dans la mise en place et le fonctionnement des structures racinaires, nodulaires et les parties aériennes. Des études ont démontré que l'existence de génotypes hyper-nodulants augmentent la fixation symbiotique. Mais ce caractère intéressant engendre des ralentissements dans la croissance racinaire et végétative de la plante. Les causes résultent d'un coût en carbone, issu de la photosynthèse, important pour la formation de ces structures symbiotiques (Bourion et al. (2007), Voisin et al. (2007, 2010, 2013) cité par (Voisin et Gastal, 2015)).

## 6 L'impact du phosphore et du molybdène sur la croissance et la fixation symbiotique de l'azote chez le pois.

### 6.1 Le phosphore

#### 6.1.1 Introduction

Le phosphore est décrit comme un macronutriment important pour la croissance des plantes. Bien qu'il soit abondant dans la plupart des sols, sa disponibilité pour les plantes est faible. Elle dépend de la façon dont le phosphore migre à travers les différents pools du sol. Le phosphore se retrouve au sein de ces trois différents pools dans le sol : le pool soluble, le pool actif et le pool fixe (Sanz-Saez *et al.*, 2017) :

1. Le pool soluble, qui est une très petite fraction du phosphore disponible dans le sol, est le pool à partir duquel les plantes savent absorber le phosphore sous la forme d'orthophosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).
2. Le pool actif contient du phosphate inorganique, qui est absorbé sur les particules du sol, et du phosphate organique, qui est minéralisé par les microorganismes. Ce pool permet de réapprovisionner le pool soluble, quand les plantes y prélèvent les phosphates disponibles.

3. Dans le dernier pool, le phosphate est séquestré et rendu insoluble par des réactions d'absorption avec différents métaux. Ceci le rend donc plus difficilement disponible pour l'assimilation des plantes.

La forme principale du phosphore pour l'absorption des plantes se trouve sous forme de phosphate. Les phosphates sont inclus dans la composition moléculaire de beaucoup de métabolites sous formes de nucléotides, acides nucléiques, phospholipides, phosphoprotéines et d'autres éléments riches en phosphore comme l'ATP. Ils jouent un rôle majeur dans la transformation d'énergie et la régulation d'activités enzymatiques, comme la photosynthèse, la respiration, la génération d'énergie et la synthèse d'acides nucléiques. (Martins *et al.*, 2017).

Bien que le phosphore soit essentiel pour toutes les plantes, les besoins en P pour les plantes fixatrices de N<sub>2</sub> sont décrits comme étant plus importants pour les plantes ne fixant pas d'azote (Divito et Sadras, 2014). Les besoins supplémentaires en phosphore sont liés au développement des nodosités et à la transformation énergétique pour la synthèse des mitochondries et des membranes symbiotiques (Martins *et al.*, 2017).

Selon diverses études, le phosphore affecte la fixation symbiotique de l'N<sub>2</sub> directement en interagissant sur la croissance, la formation et le fonctionnement des nodosités, ou indirectement en affectant la croissance de la plante hôte (Divito et Sadras, 2014).

### 6.1.2 Une carence en phosphore, un facteur limitant pour la fixation de N<sub>2</sub>

Sous des conditions de carences en phosphore, trois facteurs principaux semblent affecter la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> directement ou indirectement selon Sanz-Saez *et al.* (2017) :

1. La disponibilité des hydrates de carbones.  
Les nodosités reçoivent de leur plante hôte du carbone essentiellement sous forme de malate pour la respiration des bactéroïdes. La faible disponibilité en phosphore affecte négativement la photosynthèse de la plante et implique que moins de carbone soit délivré aux nodosités. Ceci a pour conséquence un déclin dans le développement des nodosités qui peut être associé à une inhibition de la machinerie photosynthétique.
2. L'accumulation de composés azotés.  
La croissance moins importante des plantes exposées aux faibles quantités de phosphore implique que les besoins en azote de la plante soient aussi diminués. La plante hôte a tendance à diminuer le taux de fixation de N<sub>2</sub> afin de répondre aux besoins d'azote réels de la plante. La baisse de l'activité de la nitrogénase sous de faibles disponibilités en phosphore est donc associée à une accumulation de composés azotés dans les nodosités.

### 3. La perméabilité de l'oxygène.

La perméabilité du cortex des nodosités à l'O<sub>2</sub> et, par conséquent, l'augmentation de la teneur en O<sub>2</sub> dans les nodosités qui inhibe la nitrogénase, a également été décrite comme étant affectée par la disponibilité en phosphore.

Une déficience en phosphore semble donc avoir des impacts sévères chez les plantes à différents niveaux. Selon Sanz-Saez *et al.* (2017), une carence en phosphore affecte négativement la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>, la photosynthèse et, par conséquent aussi la croissance de la plante.

#### 6.1.3 L'impact du phosphore sur la croissance et la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>.

L'influence du phosphore sur la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> chez les légumineuses reste plus ou moins confuse. Iver (1985) ainsi que Robson, O'hara et Abbott (1981) concluaient que le phosphore augmente la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> chez les légumineuses en stimulant la croissance de la plante hôte, plutôt que le développement et le fonctionnement des nodosités. Tandis que d'autres études suggèrent des effets plus spécifiques du phosphore sur l'initiation et la croissance du rhizobium ou le développement et le fonctionnement des nodosités (Gates (1974), Mosse et al. (1976) et Bonetti et al. (1984) cités par Iver (1985)).

Chez les jeunes plantes de pois, la formation des nodosités répond positivement à l'addition de phosphore. Cependant la concentration en phosphore des nodosités est peu affectée par les fournitures en phosphore. La concentration y reste constante. Elle reste toutefois plus importante que la concentration des autres organes, même en cas de déficience du nutriment. Ceci reflète la grande demande en phosphore pour la formation et le fonctionnement des nodosités (Iver, 1985).

Des expérimentations en champs ont démontrés que l'application de phosphore a des effets significatifs sur différents traits physiologiques de la plante : la hauteur, le nombre de nodosités, les rendements en biomasse et en grain, le nombre de gousses et le taux de protéine brute de la plante, etc. De plus, le phosphore est nécessaire pour promouvoir un développement rigoureux du système racinaire tout en encourageant le développement de ses nodosités (Erman *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>, des augmentations de concentration d'azote sont observées chez différentes légumineuses, dont les pois. Ces légumineuses n'ayant reçu aucun apport d'azote, mais bien un apport d'engrais phosphoré, indiquent une plus grande réactivité du système de fixation symbiotique de N<sub>2</sub> que de la croissance globale des plantes hôtes à l'augmentation de l'apport en phosphore (Israel, 1987).

## 6.2 Le molybdène

### 6.2.1 Introduction

Le molybdène est un micronutriment présent en petites quantités dans le sol sous différents états oxydatifs. La forme disponible la plus fréquente pour les plantes est l'anion soluble  $\text{MoO}_4^-$ . Cet anion est sujet à des réactions d'absorption et désorption qui dépendent des propriétés chimiques du sol : le pH, les concentrations en oxydes métalliques absorbants, les composés organiques présents dans les colloïdes et l'état du drainage (Kaiser *et al.*, 2005).

Le molybdène est inactif dans les systèmes biologiques, jusqu'à ce qu'il soit complexé par un cofacteur spécifique. Une des molybdoenzymes clés chez les plantes est la nitrate réductase qui catalyse la première étape dans l'assimilation de l'azote. Celle-ci joue donc un rôle important dans l'assimilation de l'azote (Zimmer et Mendel, 1999). D'autres molybdoenzymes sont aussi impliqués dans la réduction et l'assimilation de l'azote : la xanthine dehydrogenase (XDH) et l'aldehyde oxidase (AO) (Kaiser *et al.*, 2005).

### 6.2.2 Le rôle du molybdène dans la plante et sur la fixation symbiotique de $\text{N}_2$ .

Chez les légumineuses, le molybdène joue un rôle dans la fixation symbiotique de l'azote. Il compose l'une des deux sous-unités de la nitrogénase (la protéine Mo-Fe) qui est directement impliquée dans la réduction de  $\text{N}_2$  en  $\text{NH}_3$  (Figure 5 page 13) (Kaiser *et al.*, 2005).

L'efficacité de la symbiose dépend de la disponibilité du molybdène dans le sol. Le développement des nodosités est impacté positivement par les applications de molybdène sur les cultures (Zimmer et Mendel, 1999). Des fertilisations foliaires de molybdène induisent des effets significatifs sur le nombre de nodosités par plant et le poids sec des nodosités qui est directement corrélé à l'activité spécifique de fixation de  $\text{N}_2$  (Milev, 2014; Iver, 1985). Cependant, peu de connaissances existent sur le transport du molybdène et sa redistribution dans les tissus de la plante (Kaiser *et al.*, 2005).

D'autres études en champs ont montré qu'une carence en cet élément induisait une réduction de la concentration en leghémoglobine, de la taille et du poids sec des nodosités (Brkić *et al.*, 2004).

## 6.3 Le molybdène et le phosphore en fumure associée

Selon Rabbani *et al.* (2005), l'association de fertilisants en molybdène et en phosphore permet d'obtenir des performances significatives pour différents traits de mesure liés au rendement en grains du pois. L'application d'inoculum de *Rhizobium* en association avec 25 kg de phosphore et 1,5 kg de molybdène à l'hectare ont permis d'obtenir un rendement en grain plus important et une meilleure qualité en teneur de protéines. Une corrélation positive est retrouvée entre le nombre de nodosités et la teneur en protéines des graines de pois.

# III. Matériel et Méthode

## 1 Conditions et dispositifs expérimentaux

### 1.1 Les sites expérimentaux et l'aperçu climatique

Dans le cadre de ce travail de fin d'étude, le pois protéagineux (*Pisum sativum* L.) a été expérimenté sous ses différentes formes culturales : en culture d'hiver, de printemps et en association avec du froment. L'objectif était de comparer dans ces différentes expériences la teneur en leghémoglobine (Lb) des nodosités des plantes, exprimée en milligramme par gramme de nodosités fraîches. La leghémoglobine est une molécule indicatrice de fixation symbiotique de l'azote.

Les parcelles d'essais de pois d'hiver et en association avec du froment étaient situées à Gembloux (50°33'46''N et 4°42'41''E) sur une parcelle appartenant à la Ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Les autres parcelles de pois de printemps étaient implantées aux Isnes (50°30'57''N et 4°44'9''E), où l'APPO (Association pour la Promotion des Protéagineux et des Oléagineux) y organisait ses différents essais annuels.

La région est caractérisée par un sol limoneux à drainage naturel dans un climat tempéré océanique. La température moyenne annuelle est de 9,8°C et les précipitations moyennes sont de 834 mm par an (IRM).

L'année culturale 2017-2018 a été marquée par un hiver très pluvieux et une sortie d'hiver assez froide restant tout de même dans la normale. Par contre, le printemps a lui été caractérisé comme étant anormal avec des températures saisonnières plus importantes et des faibles précipitations dans la région de Lonzée (Gembloux) (Figure 8).

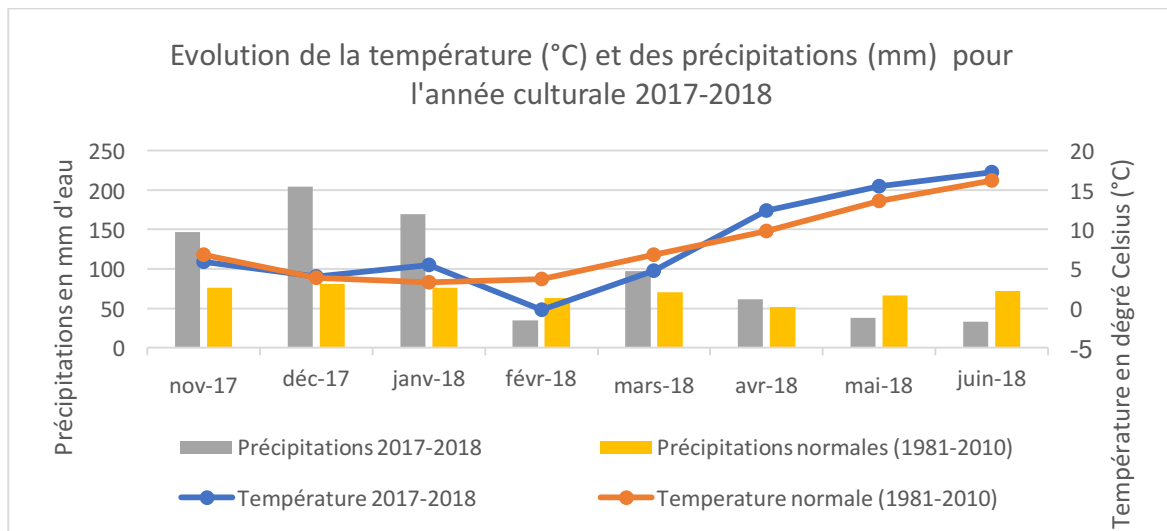


Figure 8: Evolution de la température (rouge et bleu) et des précipitations (gris et jaune) pour l'année culturale 2017-2018 à Lonzée (Gembloux, Belgique).

## 1.2 Généralités

Au cours de chaque expérience, l'unité expérimentale était une parcelle d'une longueur de huit mètres et d'une largeur de deux mètres. Une bordure de 50 cm se trouvait à chaque extrémité de la parcelle afin d'éviter les effets de bords et donc d'induire un biais dans les données récoltées (Figure 9).

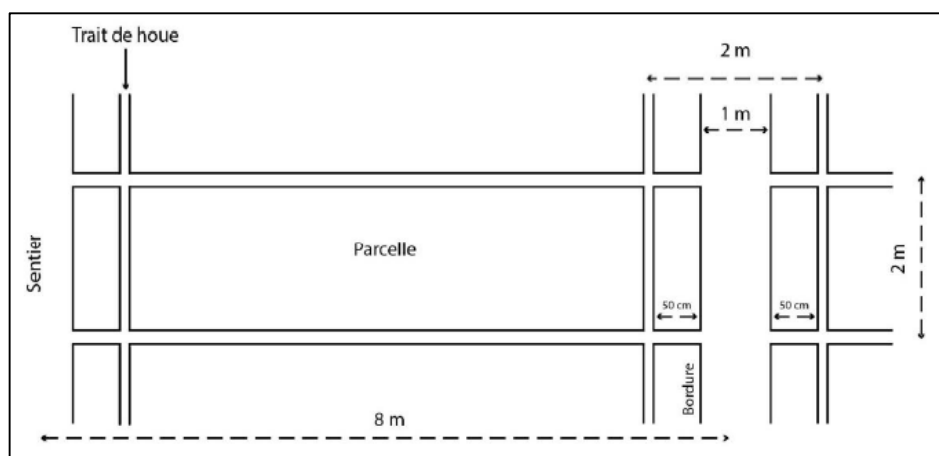


Figure 9: Schéma d'une parcelle (unité expérimentale).

L'itinéraire phytotechnique de chaque expérience est résumé en annexe.

## 1.3 Dispositifs et protocoles expérimentaux

### 1.3.1 Parcelle « Pois d'hiver »

Dans le premier dispositif expérimental, l'essai « pois d'hiver » contenait 16 parcelles, réparties en quatre blocs (Figure 10). Les parcelles ont été disposées en Split Plot afin d'étudier le facteur variétal, qui contenait quatre modalités expérimentales. Les modalités de ce facteur sont les quatre variétés de pois d'hiver : Gangster, Fresnel, Myster et Furious, répétées quatre fois au sein du dispositif expérimental.

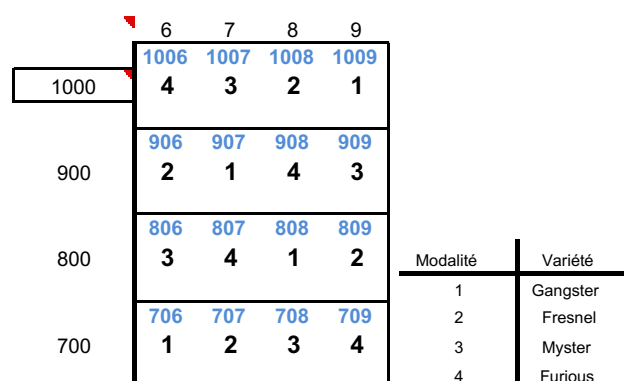


Figure 10: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois d'hiver" avec ses quatre variétés représentées. Les nombres en bleu sont les numéros de parcelles.



### 1.3.2 Pois de printemps

#### 1.3.2.1 Parcelle « Pois de printemps – Fumure »

Dans le second dispositif expérimental, l'essai « Pois de printemps – Fumure » a été subdivisé en 30 parcelles de 16 m<sup>2</sup>. Ces dernières ont été réparties en cinq blocs pour y étudier le facteur fumure (Figure 11). Le dispositif contenait huit modalités répétées quatre fois dans le dispositif expérimental, à l'exception de la modalité une qui n'a été répétée que deux fois. La variété semée était du Rebel.

Quatre modalités ont été utilisées pour les prélèvements destructifs des échantillons. Les quatre autres ont été mises en place par l'APPO pour le calcul de rendement des parcelles. Dans le cadre de cette expérience les quatre premières modalités ont été retenues :

- Modalité 1 : Témoin
- Modalité 2 : Une application de phosphore (PHYSALG25) à 50kg de P/ha
- Modalité 3 : Une application foliaire de molybdène (CHELAL Mo) à 210 g Mo/ha
- Modalité 4 : Une application associée des modalités 2 et 3.

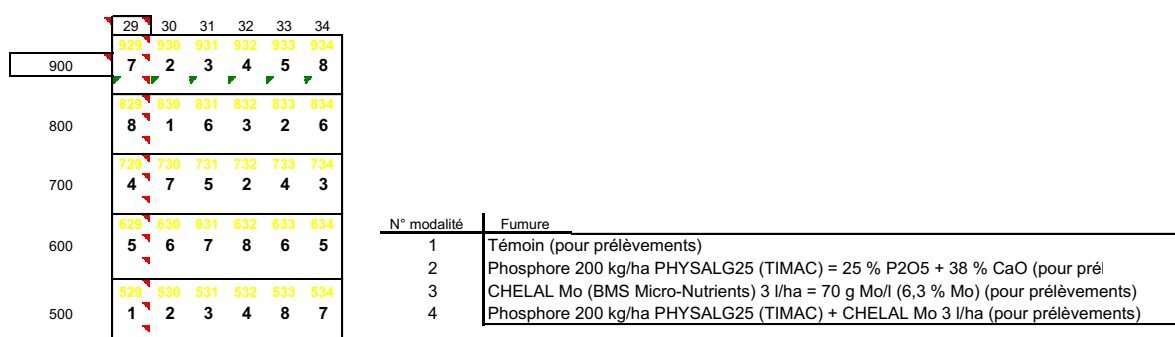


Figure 11: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois de printemps - Fumure" avec ses quatre fumures représentées. Les nombres en jaune sont les numéros de parcelles.

#### 1.3.2.2 Parcelle « Pois de printemps – variété »

Dans les parcelles du troisième dispositif expérimental « Pois de printemps – variété », le facteur variétal a été analysé chez le pois de printemps. Certaines parcelles étaient coupées par la traversée d'un pipeline (servitude de la société des eaux). Sa présence a permis la réalisation de prélèvements destructifs dans ces parcelles étant donné qu'elles ne sont pas utilisées par l'APPO pour l'obtention de résultats. Les modalités de ce facteur sont les trois variétés (Angelus, Safran et Tiberius), répétées quatre fois dans le dispositif expérimental illustré à la Figure 12.

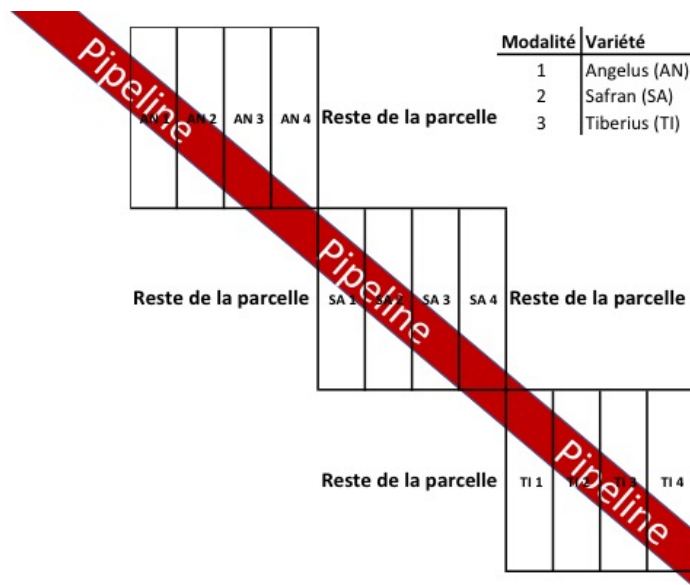


Figure 12: Dispositif expérimental de la parcelle "Pois de printemps - Variété" avec ses trois variétés représentées. Les parcelles sont traversées par un pipeline.

### 1.3.3 Pois en association avec du froment

Dans le dernier dispositif expérimental, 12 parcelles (quatre de froment pur, quatre de pois pur et quatre de pois en association avec du froment) ont été allouées à l'expérience dans la parcelle d'essai froment-pois de Jérôme Pierreux. L'objectif de l'expérience est de comparer la fixation symbiotique de l'azote dans les pois purs et en association. La variété était, dans toutes les parcelles, du Gangster pour le pois et de l'Edgar pour le froment.

## 1.4 Prélèvement des échantillons

### 1.4.1 Prélèvement racinaire

Lors de chaque prélèvement, le système racinaire complet de trois plantes par parcelle a été extrait du sol dans des tubes métalliques et en PVC d'un diamètre de 110 mm. Ceux-ci ont été enfoncés avec un marteau dans le sol pour extraire une carotte de sol d'une longueur de 25 cm (Figure 13).



Figure 13 : Illustration du prélèvement des carottes de sol avec le système racinaire de pois au moyen de tubes en PVC.

L'échantillonnage au niveau de la parcelle se faisait de manière systématique comme illustré à la Figure 14. Après chaque prélèvement de biomasse, les systèmes racinaires de trois plantes centrés sur leur système végétatif ont été extraits du sol aléatoirement autour du carré de biomasse prélevé. Ceci a été répété à plusieurs dates.

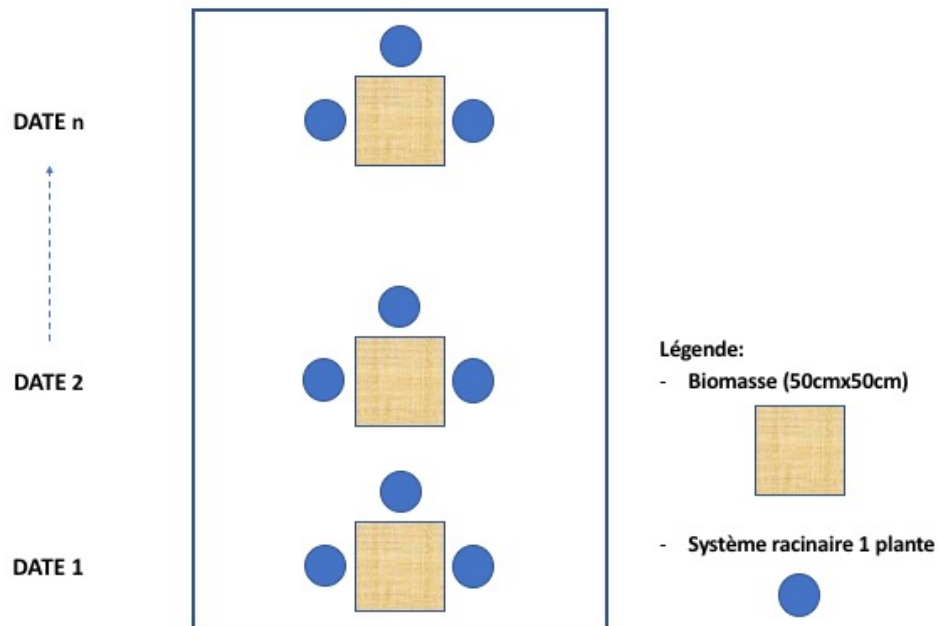


Figure 14: L'échantillonnage au niveau de l'unité expérimentale (parcelle de 16m<sup>2</sup>).

Ensuite, après avoir été enlevées du sol, les carottes de sol ont été mises à tremper pendant une nuit avant d'être lavées le lendemain. Cette étape est importante afin d'extraire le système racinaire le plus complet possible sans le casser en différents endroits.

#### 1.4.2 Autres mesures

Lors de chaque prélèvement racinaire, une mesure de la biomasse aérienne de 50 cm sur 50 cm était aussi réalisée comme expliqué ci-dessus et illustré à la figure (Figure 14).

Les stades de développement phénologiques de plusieurs plantes dans chaque parcelle ont aussi été enregistrés lors de chaque prélèvement. Les mesures se sont basées sur l'échelle BBCH du pois protéagineux.

#### 1.4.3 Suivi dynamique du système racinaire des plantes et des teneurs en leghémoglobine des nodosités du pois d'hiver

Un suivi dynamique de l'architecture racinaire a aussi été réalisé pour les plantes de pois au cours de sa saison culturale jusqu'à sa floraison. Cinq plantes furent prélevées à différentes dates dans les bordures des parcelles. Celles-ci ont été nettoyées et scannées le jour même afin d'obtenir une belle illustration du système racinaire de la plante. Enfin, après l'acquisition de l'image scannée, les plantes avec leurs nodosités ont été mises à l'étuve. Une image hyperspectrale a ensuite été acquise dans le but de quantifier la teneur en Lb de leurs nodosités au cours du temps.

## 1.5 Préparation des échantillons

### 1.5.1 Généralités pour toutes les expériences

La préparation des échantillons racinaires est l'étape qui précède l'acquisition des images sous la caméra hyperspectrale. Elle consiste à laver et sécher les échantillons qui ont été mis à tremper durant une nuit entière.

L'immersion des tubes en PVC pendant une nuit dans des seaux d'eau a permis d'extraire les carottes de sol les plus entières possibles des tubes, sans abimer leur système racinaire et leurs nodosités. Les carottes de terre ont ensuite été aspergées au moyen d'un pistolet d'arrosage pour séparer la terre du système racinaire. Les racines, une fois rincées et lavées, ont été étalées avec leurs nodosités dans de l'eau sur un grillage de fine maille (moustiquaire) afin de bien les exposer dans un plan bidimensionnel (Figure 15). Un étalement correct est important afin d'éviter que les racines et les nodosités ne se recouvrent. Les nodosités doivent être bien exposées et identifiables pour permettre l'acquisition optimale d'une image hyperspectrale.



*Figure 15: Illustration d'un système racinaire d'une plante de pois étalée sur un treillis de fine maille (moustiquaire) après avoir été séché à l'étuve à 60°C pendant 48 heures.*

Ensuite, les racines lavées ont été placées entre deux carrés de moustiquaire de 30 cm sur 30 cm. Ceci a permis de les protéger contre d'éventuels chocs ainsi que d'éviter des pertes racinaires. Après le lavage, les échantillons, protégés par les deux moustiquaires, ont été placés dans un sac microperforé et mis dans une étuve ventilée pendant 48 heures à 60°C afin d'être séchés.

A la sortie de l'étuve, le système racinaire a été découpé en quatre horizons et déposé dans une feuille de papier pliée au préalable pour les conserver. Les horizons correspondent à des tranches racinaires de 5 cm allant de 0 à 15 cm dans le sol. La dernière tranche était constituée de la fin du système racinaire, dont la longueur racinaire variait d'un prélèvement à l'autre (Figure 16). La base zéro correspondait à la position de la graine du pois sur le système racinaire. Etant donné que les semences ne sont pas toutes semées à la même profondeur, il

était nécessaire de déterminer une base zéro facile à identifier. Enfin, les échantillons ont été conservés à température et humidité ambiante jusqu'à l'acquisition de l'image hyperspectrale.

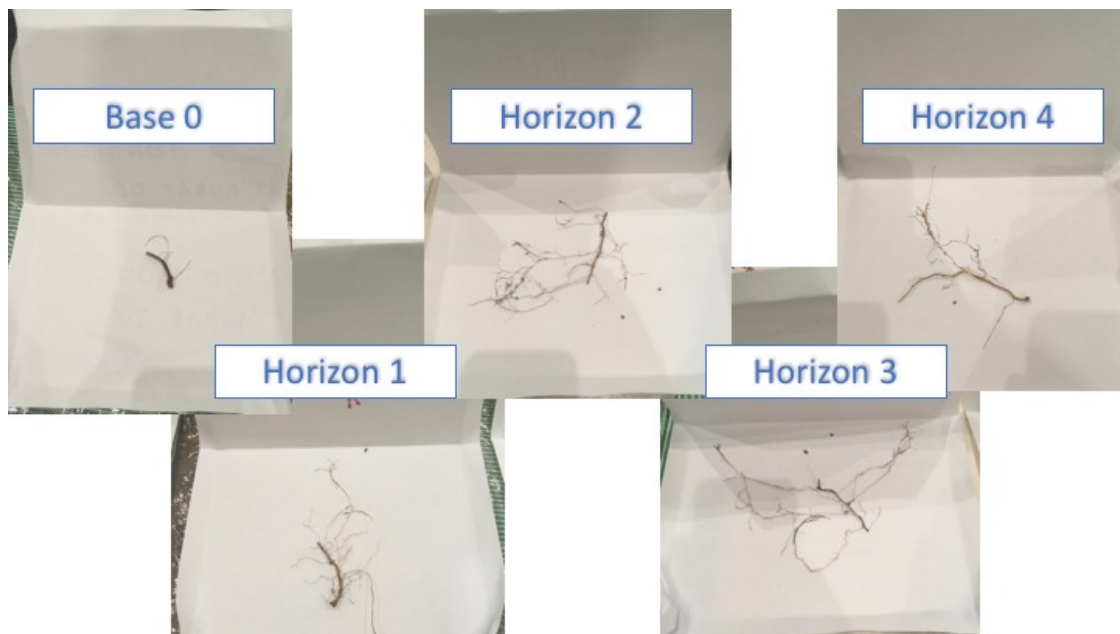


Figure 16: Découpage du système racinaire d'un plant de pois en horizons de 5 cm.

### 1.5.2 Cas particulier de l'expérience « pois d'hiver »

Dans le cas de l'expérience « pois d'hiver », les nodosités de chaque plante ont été enlevées une par une au moyen de pinces à épiler. Ces nodosités ont ensuite été stockées dans des tubes d'Ependorf de 1,5 ml avant d'être refroidies dans de l'azote liquide pour être ensuite stockées définitivement dans un réfrigérateur à -80°C. Une semaine avant l'acquisition des images, celles-ci ont été séchées dans une étuve par convection pendant 24 heures à 70°C dans des boîtes de Pétri.

## 2 Analyse des échantillons par imagerie hyperspectrale proche infrarouge

### 2.1 Acquisition des images hyperspectrales proches infrarouge

Les images hyperspectrales proche infrarouge des nodosités seules ou liées aux racines, séchées et préparées au préalable, ont été acquises selon la même méthode que celle décrite par Vermeulen *et al.* (2012) et Eylenbosch *et al.* (2018a).

Les images NIR-HSI ont été acquises à l'aide de la caméra de type "line scan" SWIR XEVA CL 2.5 320 TE4 (SPECIM Ltd, Oulu, Finland) équipée d'un spectrographe ImSpector N25E (XENICS nv, Leuven, Belgium) qui contient un détecteur (mercure cadmium telluride) refroidi et stabilisé à la température ambiante. La caméra prend une image des échantillons racinaires sur une bande transporteuse en mouvement (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie) (Figure 17).

Afin d'avoir une bonne résolution de l'image acquise en mouvement, la vitesse d'avancement est réglée de façon à ce que les pixels possèdent une forme carrée.



Figure 17: Caméra line scan hyperspectrale proche infrarouge (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie)

Les images ont été acquises à l'aide du logiciel HyperProVB (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie). Pour chaque image hyperspectrale, un spectre proche infrarouge de 209 longueurs d'ondes (1118-2425 nm), résultant de 32 mesures d'absorbance, a été enregistré pour chaque pixel. L'image est caractérisée par une largeur de 320 pixels, ce qui représente une ouverture de 10 cm. La longueur de l'image dépend de la taille de l'échantillon et la résolution spectrale est d'environ 6,3 nm.

Toutes les heures, une calibration de la caméra était effectuée au moyen d'une céramique blanche (référence blanche) et en bloquant l'arrivée de lumière (référence noire). La calibration permet de détecter et supprimer les pixels morts. La réponse de ces pixels morts génère des « spikes<sup>10</sup> » qui ne peuvent pas être pris en compte dans le traitement ultérieur des spectres acquis sur l'image.

Les échantillons ont été placés sur le tapis d'avancement de façon à ce qu'ils ne dépassent pas la plage de mesure de la caméra. Ils ont été exposés le mieux possible afin d'éviter un recouvrement des racines sur les nodosités.

## 2.2 Vérification des acquisitions spectrales

Avant d'analyser les images, il était nécessaire de vérifier que celles-ci ont été acquises correctement par la caméra hyperspectrale. Deux standards ont permis de vérifier cette condition :

Le premier, un « standard ergot », repose sur la méthode de Vermeulen *et al.* (2012). Il permet de s'assurer que les pixels, acquis pour un échantillon standard composé de quantités de grains d'ergot et blé connus, soient prédits correctement.

---

<sup>10</sup> Spikes = pics d'absorbance, liés aux pixels morts, qui répondent avec une valeur anormalement faible ou élevée.

Le second, un « standard paille » établi par D. Eylenbosch *et al.* (2018b), permet aussi de s'assurer que l'échantillon, composé de résidus de cultures (paille), soit bien prédit comme étant des résidus de culture (paille) et non comme des éléments appartenant à d'autres classes spectrales présentes dans le modèle utilisé. Sur l'image ci-dessus (Figure 18), tout ce qui se trouve en jaune est bien prédit comme étant des résidus de culture (paille). Les points bruns sont prédits comme des racines. Ce standard était plus souvent utilisé en journée en raison de sa facilité de manipulation en comparaison avec le « standard ergot », qui lui était utilisé en début et en fin de journée, et quelques fois en cours de journée afin de vérifier le bon fonctionnement de la caméra hyperspectrale.

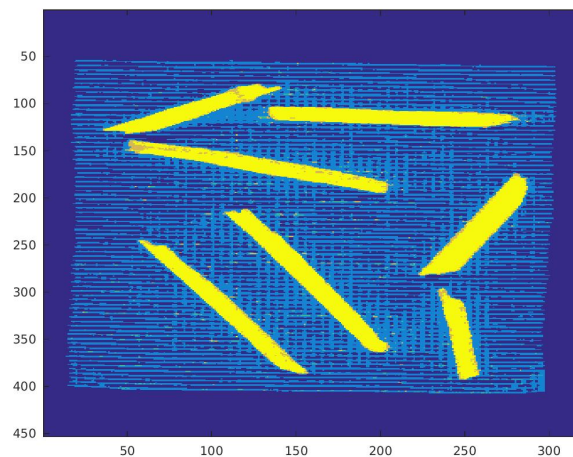


Figure 18: Prédiction des résidus de culture (paille) grâce aux arbres de classifications dichotomiques des Séparateurs à Vastes Marges (SVM) sur une image hyperspectrale acquise dans le proche infrarouge (NIR).

## 2.3 Analyse des images hyperspectrales

Une fois les images hyperspectrales proches infrarouges acquises, la nature de chaque pixel a été prédite sur base du profil du spectre acquis pour ce dernier. Trois différentes classes spectrales pouvaient être identifiées sur chaque image : les spectres du tapis, les spectres des racines de pois et/ou les spectres des nodosités.

Un arbre de classification dichotomique constitué de deux algorithmes d'analyse discriminante a permis de séparer ces différentes classes. Dans un premier temps, tous les pixels étant classés comme du tapis ont été discriminés du reste de l'échantillon. Ensuite, les nodosités ont été séparées des racines de pois comme illustré à la (Figure 19). Les algorithmes de discrimination ont été construits par D. Eylenbosch *et al.* (2018a) et se sont basés sur l'utilisation de modèles SVM (*Support Vector Machine*).

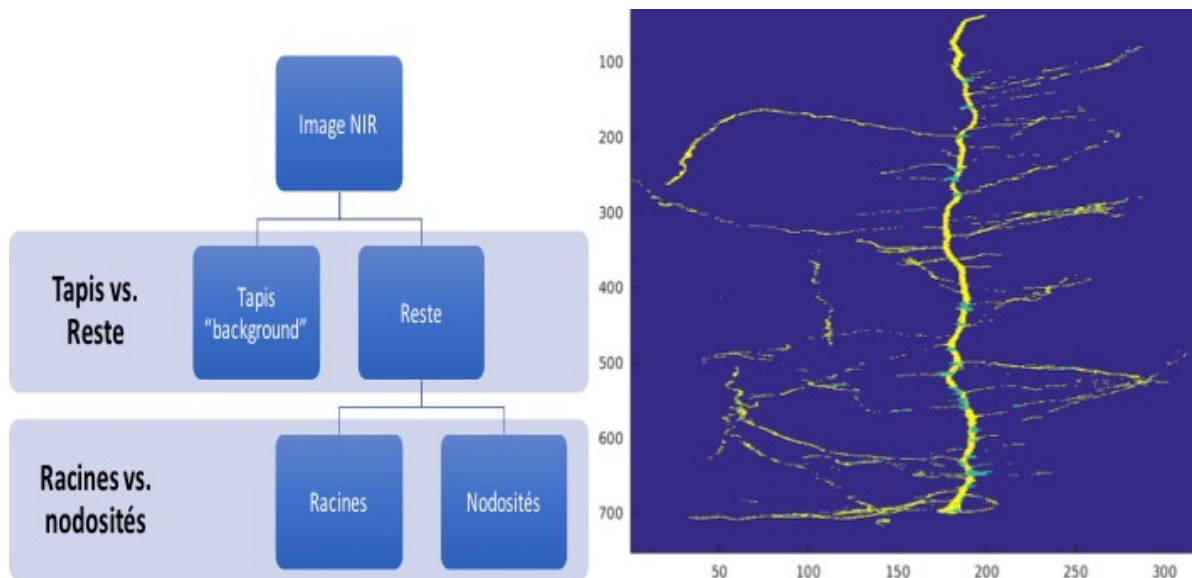


Figure 19: Arbre de classification dichotomique basé sur deux modèles SVM et permettant la classification en trois classes spectrales des spectres PIR extraits d'une image hyperspectrale PIR (adapté de Eylenbosch et al., 2016). Les pixels bleu foncé représentent le tapis, les pixels jaunes les racines de pois et les bleu claire les nodosités du pois.

Une fois que les pixels des nodosités ont été discriminés, leur teneur en milligramme de leghémoglobine par gramme de nodosités fraîches ont pu être prédites par le modèle de régression PLS calibrée préalablement selon la même méthode que Damien Eylenbosch *et al.* (2018a). La calibration de ce modèle est décrite dans le point 3.

La sortie des résultats pour chaque image hyperspectrale est la suivante :

1. La concentration moyenne en Lb des pixels prédits comme étant des nodosités ;
2. Le nombre de nodosités identifiées sur l'image. Chaque nodosité correspond à un agglomérat de minimum 10 pixels qui se touchent entre eux ;
3. Le nombre de nodosités pour lesquels une teneur positive en Lb est prédite ;
4. La concentration moyenne en Lb de toutes nodosités identifiées et ayant une taille minimum de 10 pixels ;
5. L'écart type de la teneur en Lb pour toutes les nodosités identifiées et ayant une taille minimum de 10 pixels ;
6. La valeur maximale et minimale en Lb d'une nodosité parmi toutes les nodosités identifiées et ayant une taille minimum de 10 pixels.

Toutes les images ont été prédites avec le logiciel Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Les modèles de discrimination et de régression ont été construits avec la PLStoolbox 7.8 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA). Le modèle de reconnaissance de forme a été construit avec la MIAtoolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA).



### 3 Calibration du modèle de régression entre le contenu en leghémoglobine et les spectres proche infrarouge correspondant des nodosités.

#### 3.1 Prélèvement des nodosités

Pour établir le modèle de régression entre le contenu en leghémoglobine (Lb) des nodosités et leurs spectres proche infrarouge correspondants, des prélèvements de nodosités de pois ont été réalisés pendant plusieurs semaines. 63 échantillons ont été récoltés entre le 20 avril 2018 et le 15 juin 2018. Pendant les quatre premières semaines, les prélèvements de nodosités provenaient de pois d'hiver de la variété Gangster et de pois de printemps de la variété Safran pour les quatre dernières semaines. Le changement inopiné vers le pois de printemps résulte de l'apparition de sitones qui ont détruit les nodosités primaires sur le système racinaire du pois d'hiver.

Une quantité minimale de nodosités de pois dans chaque échantillon était nécessaire pour permettre une quantification chimique de leur teneur en Lb sur des nodosités fraîches et d'extraire les spectres NIR correspondants sur des nodosités séchées préalablement. La répartition était telle qu'une septantaine de nodosités ont été prélevées sur le système racinaire d'un même ensemble de plantes pour la quantification chimique et une trentaine pour l'extraction de leur spectre NIR. Les nodosités ont été conservées dans des tubes d'Ependorf de 1,5 ml à - 80 °C après avoir été refroidies dans de l'azote liquide. Les tubes ont été conservés au congélateur jusqu'à ce que la quantification chimique et le séchage en étuve des nodosités aient eu lieu.

#### 3.2 Quantification chimique

La teneur en leghémoglobine des nodules congelés a été mesurée chimiquement à la fin du mois de juin. La quantification s'est réalisée selon la méthode de la cyanméthémoglobine, citée plus haut dans le point 4.4 : « Propriétés spectrales de la leghémoglobine et sa quantification » et décrite en détail par Wilson and Reisenauer (1963) et Damien Eyllenbosch *et al.* (2018a).

Cette méthode est basée sur la mesure spectrophotométrique et utilise la solution de Drabkin. Cette solution a été préparée avec 52 mg de KCN, 198 mg de  $K_8Fe(CN)_6$  et 1 g de  $NaHCO_3$  dissout dans l'eau et jaugé jusqu'à 1000 ml.

Pour extraire la leghémoglobine, des nodules congelés ont été broyés dans de l'azote liquide dont 100 mg de nodules broyés ont été transférés dans des tubes d'Ependorf de 1,5 ml. Pour chaque échantillon, trois sous-échantillons ont été préparés. Ils ont ensuite été stockés

quelques jours à  $-80^{\circ}\text{C}$ , le temps de réaliser plusieurs broyages et en attendant de pouvoir faire les analyses.

Afin de réaliser la quantification de la Lb, 0,6 ml de solution de Drabkin a été ajoutée dans les tubes d'Ependorf contenant 100 mg de broyat de nodosités congelées. Le mélange a été centrifugé pendant 15 minutes à une force centrifuge de 500 G et une température de  $12^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant a ensuite été transféré dans un autre tube d'Ependorf de 2 ml. La Lb contenue dans la phase solide a été extraite et centrifugée deux fois en plus avec 0,6 ml de solution Drabkin. Les surnageants ont été combinés et complétés à 2 ml avec la solution de Drabkin, et ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes à 20 000 G et  $15^{\circ}\text{C}$ . L'absorbance du surnageant a été lue dans une cellule de 1,5 ml à 540 nm avec un spectrophotomètre UV-visible (UV-1650 PC, Shimadzu, Japon), étalonné avec la solution de Drabkin.

Une courbe d'étalonnage a été calculée sur base de la solution de Drabkin pure et de cinq dilutions d'hémoglobine cristalline humaine (Sigma-Aldrich Cat n° H7379) contenant 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6 mg d'hémoglobine par ml de solution Drabkin. Les courbes de référence établies ont toujours obtenu un coefficient de régression supérieur à 0,99. Les résultats ont ensuite été exprimés en milligrammes de leghémoglobine par gramme de nodules frais ( $\text{mg g}^{-1}$ ). Une courbe d'étalonnage était établie à chaque jour de mesure.

### 3.3 Acquisition des spectres NIR et prétraitement

Après la quantification chimique, les 63 autres échantillons contenant chacun 30 nodosités ont été mis à sécher dans une étuve à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures (Figure 20).

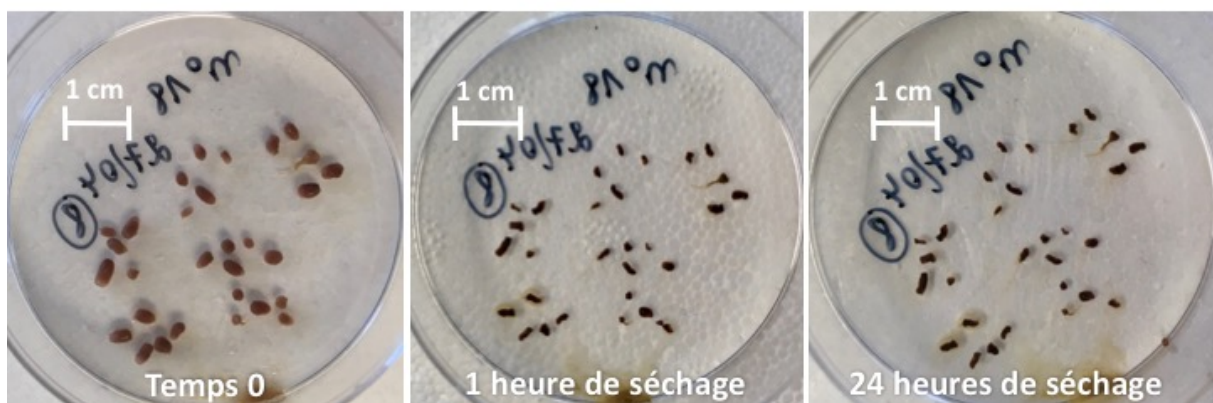


Figure 20: Illustration des nodosités avant d'être séchées (à gauche), une heure après le séchage par convection à  $70^{\circ}\text{C}$  (au milieu) et à la fin du séchage 24 heures plus tard (à droite).

Les images hyperspectrales proches infrarouges correspondantes des nodosités ont été acquises grâce au logiciel HyperPro VB (BurgerMetrics SIA, Riga, Latvia), comme expliqué plus haut dans le point 2.1 « Acquisition des images hyperspectrales proches infrarouge ». Le spectre moyen représentatif de chaque échantillon des nodosités a ensuite été mesuré à partir de chaque image hyperspectrale avec le logiciel HyperSee (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie).

Une fois que les spectres NIR moyens des nodosités ont été acquis, un prétraitement s'en est suivi. Afin d'éliminer les régions de bruits au début et à la fin des spectres NIR, seules les longueurs d'onde comprises entre 1432 nm et 2368 nm ont été conservées. Le bruit restant et la tendance croissante observée dans les spectres moyens ont été supprimés. Trois transformations ont eu lieu : un lissage de Savitzky-Golay (ordre 0, largeur du filtre 7), une transformation detrend et une normalisation avec la transformation « standard normal variate » (SNV).

### 3.4 Relier l'imagerie hyperspectrale NIR à la teneur en leghémoglobine

A l'issue du prétraitement des spectres NIR, 20 échantillons furent sélectionnés pour la validation du modèle de régression et les 43 autres pour la calibration du modèle. La sélection des 43 échantillons pour la calibration a été réalisée par l'algorithme Duplex décrit par (Snee, 1977).

La régression PLS a été utilisée pour construire un modèle de calibration entre la teneur en leghémoglobine et les spectres NIR des nodules de pois. La discussion de ce modèle de calibration est décrite plus bas dans le point « IV. Résultat et discussion ».

## 4 Difficultés rencontrées

### 4.1 Difficultés expérimentales en champs

Lors de la réalisation de ce travail de fin d'étude, plusieurs difficultés ont été rencontrées dans le calendrier cultural de la culture du pois d'hiver.

Dans la parcelle « pois d'hiver », le sol n'a pas tout à fait été ressuyé après le semis de fin novembre. Les fortes pluies de l'hiver ont compacté le sol et donc ralenti le développement de la plante de manière générale. De plus, les fortes gelées à la sortie de l'hiver ont touché un certain nombre de tiges. Un comptage réalisé à la sortie de l'hiver a pu recenser une mortalité moyenne de 17 % des plantes diminuant la densité moyenne des plantes de pois au m<sup>2</sup> de 75 à 63.

Deuxièmement, des pigeons ramiers sont venus ravager la culture au printemps qui est un moment clé dans le développement végétatif de la culture du pois. Plusieurs moyens ont été mis en œuvre pour essayer de les dissuader de venir : des bâtons munis de rubans prenant le vent, des épouvantails et même le cloisonnement complet de la culture avec un treillis de poule d'une hauteur de 1m. Le broutage des bourgeons terminaux occasionné par les pigeons ramiers a lui aussi ralenti le développement de la culture.

Enfin, les hautes températures estivales ont permis aux sitones de proliférer dans d'excellentes conditions. La ponte de leurs œufs dans les nodosités a permis aux larves de se

développer et de les ravager (Figure 21). La presque totalité des nodosités se trouvant sur les racines pivotantes furent détruites.



Figure 21: Illustration des sitones et de leurs larves présentes dans les carottes de sol lors du lavage des systèmes racinaires le 18 mai 2018.

Toutes ces difficultés m'ont amené à changer de parcelle expérimentale en cours d'expérience et donc de prélever à nouveau d'autres systèmes racinaires de pois dans des cultures de pois de printemps et de pois en association avec du froment. Des sitones étaient aussi observables dans les autres parcelles, mais avec des dégâts moins importants.

## 4.2 Difficultés dans la calibration du modèle

Lors de la création du modèle de régression les échantillons récoltés pour la calibration du modèle n'ont pas été séchés dans les mêmes conditions que les échantillons racinaires obtenus sous les différentes modalités expérimentales. Les nodosités utilisées pour la calibration ont été séchées dans une étuve par convection à 70°C, alors que les prélèvements racinaires ont été séchés dans une étuve avec ventilation à 60°C.

Cette différence dans le séchage a entraîné des modifications au niveau des spectres acquis sur les nodosités et n'a pas permis de prédire les images de la même manière. Ceci induit donc des biais dans la quantification des échantillons racinaires. Une comparaison du modèle de régression établi en 2018 sur des nodosités séchées par convection et celui mis au point par D. Eylenbosch en 2017 sur des nodosités séchées avec ventilation sera mise en évidence dans l'interprétation des résultats.

## 5 Analyse Statistique

L'analyse statistique des différents teneurs en Lb des nodosités et des prélèvements de biomasses aériennes dans les différentes expériences a été réalisée grâce aux logiciels SAS 9.4 (Statistical Analysis System) et R (R Core Team, 2017). Le package "agricolae" a été utilisé sur R pour les analyses de la variance (ANOVA) et les tests de Student-Newman-Keuls pour la structuration des moyennes (De Mendiburu, 2017). Les conditions d'application ont été vérifiées par les tests de Bartlett et Shapiro-Wilk.

# IV. Résultats et discussions

## 1 Validation des modèles de régression PLS

### 1.1 Discussion de la validation du modèle de régression PLS 2018

Dans le but de pouvoir prédire la teneur en leghémoglobine (Lb) de nodosités préalablement séchées dans une étuve par convection, le modèle de régression PLS 2018 a été créé. La régression a permis de lier la teneur en Lb des nodosités, obtenues chimiquement avec la méthode de la cyanméthémoglobine, et les spectres NIR correspondants, extraits de nodosités issues d'un même ensemble de plantes. La teneur en Lb des nodosités est exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

Dans le modèle de régression PLS, huit variables latentes ont été utilisées pour prédire la teneur en Lb des nodosités. Elles permettent d'expliquer 99,27 % de la variabilité de la leghémoglobine au sein des 43 échantillons utilisés pour la calibration. Le coefficient de détermination de calibration ( $R^2$  Cal) est de 0,86 avec une erreur quadratique moyenne d'étalonnage (RMSEC) de 0,40. La validation croisée du modèle PLS a donné un coefficient de détermination ( $R^2$  CV) de 0,75 avec une erreur quadratique moyenne (RMSECV) de 0,53 (Figure 22).

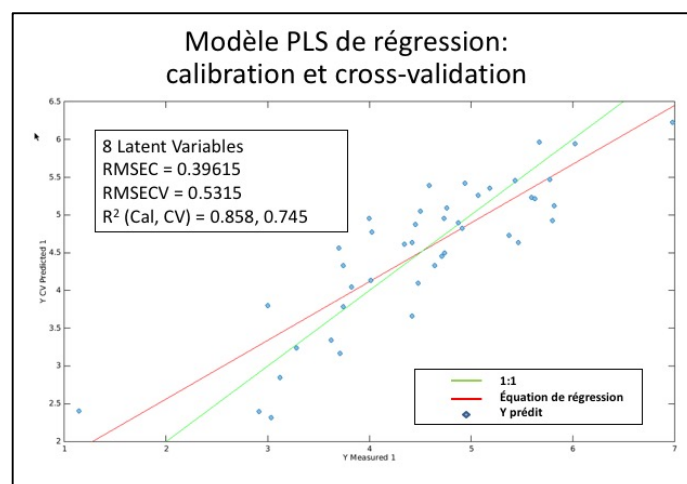


Figure 22: Représentation des échantillons de nodosités utilisés pour la calibration du modèle de régression PLS qui est exprimée en fonction de leur valeur prédite du modèle de régression et leur teneur réelle en Lb mesurée chimiquement par la méthode de la cyanméthémoglobine. La teneur en Lb des nodosités est exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

La validation du modèle PLS sur les 20 échantillons de nodosités restants a donné un  $R^2$  de 0,718 et une erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP) de 0,70 (Figure 23).

Au vu des résultats obtenus, les teneurs en Lb des échantillons de validation prédits par la régression sont un peu moins bonnes que celles obtenues avec la validation croisée. Le coefficient de détermination est de 0,72 comparé au 0,75 de celui de la validation croisée. De plus, son erreur quadratique moyenne est aussi plus importante. Celle-ci s'explique par la présence de deux échantillons de nodosités qui possèdent des teneurs en Lb plus faibles que

la moyenne des autres échantillons créés pour la calibration du modèle. Ces deux échantillons, entourés en bleu sur la Figure 23, ont été ajoutés dans le modèle de régression dans le but d'obtenir un modèle plus robuste pour des valeurs plus faibles que 3 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Car, en effet, peu d'échantillons issus de la calibration possédaient une teneur inférieure à 3 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. La majorité des échantillons se trouvaient dans une gamme qui variait de 3 à 6 mg de Lb.

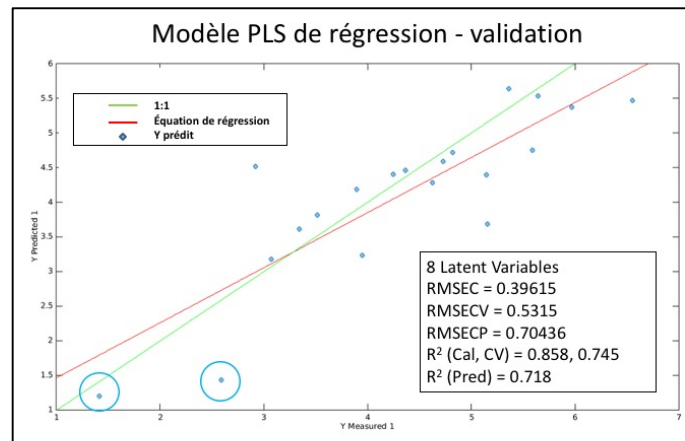


Figure 23: Représentation des échantillons de nodosités utilisés pour la validation du modèle de régression PLS qui est exprimée en fonction de leur valeur prédite du modèle de régression et leur teneur réelle mesurée chimiquement par la méthode de la cyanméthémoglobine. La teneur en Lb des nodosités est exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

## 1.2 Comparaison de la prédiction de la teneur en Lb des nodosités séchées dans une étuve par convection et dans une étuve ventilée

### 1.2.1 Introduction

Les nodosités, utilisées pour de la calibration du modèle de régression PLS, ont été séchées dans une étuve **par convection à 70°C** comme expliqué dans la partie « Matériel et méthode ». Cette étuve a été utilisée par raison de facilité puisqu'elle se trouvait dans le laboratoire où la quantification chimique a eu lieu. Cependant, pour toutes les expérimentations réalisées en champs, les échantillons racinaires ont été séchés dans une étuve **avec ventilation à 60°C**. Cette différence de séchage semble induire des propriétés physico-chimiques qui ne sont pas identiques. D'un point de vue visuel, les nodosités issues des 2 types de séchages différents, et récoltées à partir d'un même ensemble de plantes à la même date, semblent se différencier au niveau de leur couleur (Figure 24). L'échantillon de nodosités séchées par convection, à gauche sur la figure, est de couleur plus vive que l'échantillon de nodosités séchées avec ventilation, à droite sur la figure.

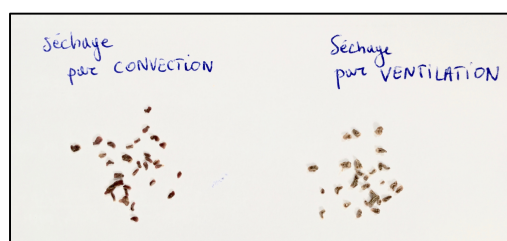


Figure 24: Illustration des nodosités séchées par convection (à gauche) et avec ventilation (à droite).

De plus, cette variation entre les deux types de séchages a aussi permis de mettre en évidence une différence spectrale au sein des nodosités. Le spectre moyen des nodosités issu des deux types de séchages est représenté à la Figure 25 ci-dessous. Des différences d'absorbances sont remarquées pour les deux types de séchages pour les longueurs d'ondes dans le spectre proche infrarouge. L'absorbance pour les longueurs d'ondes variant de 1000 à 2000 suit une même tendance, mais avec une absorbance plus importante pour les nodosités séchées par convection. Aux alentours de 2000 nm, les absorbances des longueurs d'onde ne suivent plus exactement la même tendance. L'absorbance des longueurs d'ondes pour le séchage par convection reste toutefois plus importante.

D. Eylenbosch *et al.* (2018a) indiquait pouvoir prédire la teneur en Lb des nodosités grâce à une présélection des longueurs d'ondes qui sont les plus représentatives pour la quantification de la Lb. Il les a ensuite utilisées dans un modèle de régression linéaire multiple. Les longueurs d'ondes identifiées étaient : 1461, 1537, 1732, 1934, 2022, 2110 and 2236 nm.

L'absorbance des longueurs d'ondes présentes aux alentours de 2000 nm semblent être différentes pour les deux types de séchages. Ce segment dans le proche infrarouge comprend trois longueurs d'ondes (1934, 2022 et 2110 nm) les plus représentatives pour prédire la teneur en Lb des nodosités selon le modèle établi par D. Eylenbosch *et al.* (2018a).

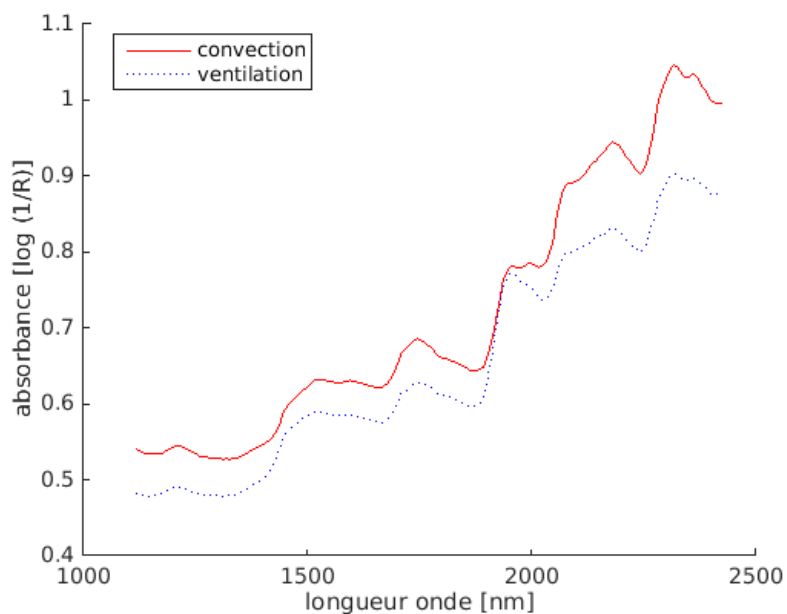


Figure 25: Représentation des spectres moyens dans le proche infrarouge pour les nodosités issues des sous échantillons des deux types de séchages. En rouge est représenté le spectre moyen des nodosités séchées dans une étuve à convection et en bleu le spectre moyen des nodosités séchées dans une étuve avec ventilation).

Cette différence spectrale ne semble pas permettre de prédire la Lb des nodosités de la même manière. Le modèle de régression, créé sur base des nodosités séchées par convection, semble donc pouvoir quantifier la teneur en Lb des nodosités seulement dans certaines conditions qu'il faudra analyser.

L'analyse a pu être mise en évidence grâce à neuf échantillons pour lesquels des sous échantillons avaient été séchés différemment afin d'étudier l'effet des différentes méthodes de séchage sur les spectres PIR. Ces neuf échantillons de nodosités provenaient d'un même ensemble de plantes et ont été séchés de deux façons différentes (par convection et avec ventilation). Ce jeu de données a permis de mettre en évidence ces différences et de conclure dans quelles conditions le modèle de régression PLS pouvait être utilisé de façon optimale et le plus précisément possible. Ces différents points seront développés dans le point 1.2.2 « Illustration des résultats ».

### 1.2.2 Illustration des résultats

Dans l'optique d'illustrer cette différence spectrale entre les deux types d'échantillons de nodosités séchées par convection et avec ventilation, le modèle de régression PLS 2018 a été utilisé pour comparer les prédictions des teneurs des nodosités, exprimées en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Une valeur labo de référence a aussi été mesurée à titre de comparaison afin de pouvoir tirer quelques conclusions.

*Il est à noter que les nodosités proviennent d'un même ensemble de plantes, dont seul le séchage des nodosités diffère. Leur teneur en Lb est donc supposée être identique. Elles ont été récoltées à trois dates différentes, à un intervalle d'une semaine lors de la floraison du pois de printemps.*

#### 1.2.2.1 Pourcentage de nodosités prédites

La première constatation observée à la Figure 26 est le fait que les nodosités séchées dans l'étuve avec ventilation ne sont pas toutes prédites avec une teneur en Lb positive par le modèle de régression PLS 2018. A contrario, les nodosités séchées par convection sont presque toutes prédites positivement.

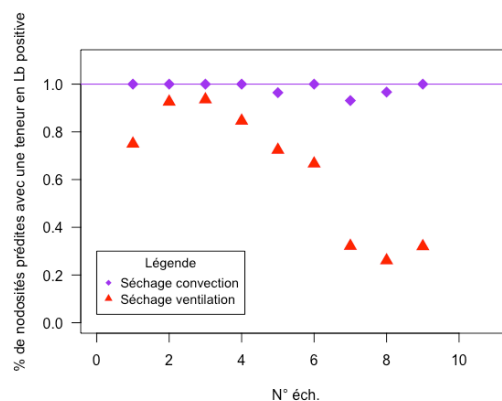


Figure 26: Le pourcentage de nodosités issues des deux types d'échantillons (convection vs. ventilation) qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive par le modèle de régression PLS 2018.

Il est attendu que la plupart des nodosités aient une teneur en Lb positive lors de la floraison de la plante. Dans le cas des nodosités séchées par convection, 98% sont prédites avec une teneur en Lb qui est positive par le modèle de régression PLS 2018. Dans l'autre cas, les nodosités séchées avec ventilation sont prédites positivement, en moyenne, seulement dans 63% des cas.



Une nette différence de quantification est aussi observable entre les deux types de séchages puisque certaines nodosités séchées avec ventilation (à gauche sur la Figure 27) sont prédites avec des teneurs en Lb qui sont nulles par le modèle de régression PLS 2018 (tache gris clair sur la Figure 27). De plus, leur teneur semble plafonner à 4 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches alors que les teneurs des nodosités séchées par convection varient fortement et à des valeurs plus élevées (à droite sur la Figure 27).

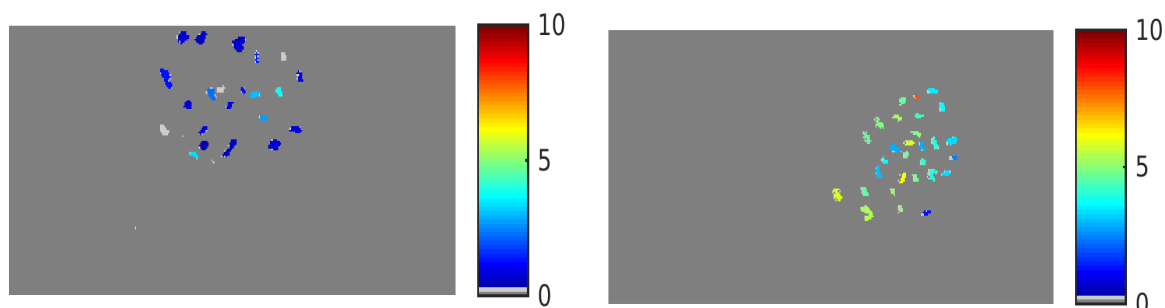


Figure 27: Illustration de la prédiction de nodosités séchées par ventilation (à gauche sur l'image) et séchées par convection (à droite sur l'image) par le modèle de régression PLS 2018. La teneur est représentée par une échelle de couleur qui est exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

#### 1.2.2.2 Concentration maximale de la teneur en Lb au sein d'une nodosité

Ensuite, une analyse plus en profondeur de la quantification de la teneur en Lb des nodosités a été réalisée sur les nodosités qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive. La mesure obtenue et illustrée à la Figure 28 est la teneur maximale d'une nodosité qui a été enregistrée parmi toutes les nodosités dans chaque échantillon.

Il est attendu que cette teneur moyenne soit élevée vu que les nodosités ont été récoltées à la floraison de la plante, le moment où l'activité fixatrice symbiotique de l'azote est à son pic.

Concentration moyenne maximale en Lb d'une nodosité d'un échantillon

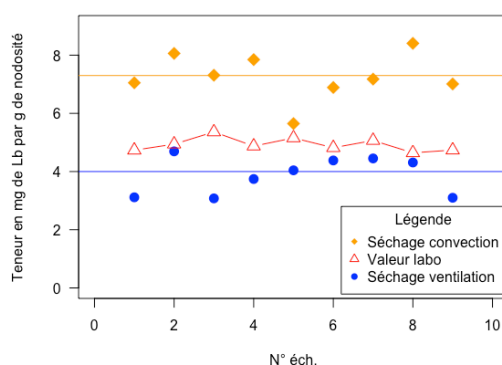


Figure 28: La teneur maximale en Lb d'une nodosité parmi toutes les nodosités présentes dans l'échantillon pour les deux types de séchages : convection (en orange) et par ventilation (en bleu). La teneur moyenne en Lb de ces échantillons est illustrée en rouge.

La valeur maximale prédite en Lb des nodosités séchées par convection est systématiquement plus importante que celles séchées avec ventilation. Les valeurs obtenues pour les nodosités séchées par convection reflètent plus la réalité du terrain. Car en effet, la valeur maximale prédite en Lb des échantillons est plus importante que la valeur moyenne réelle obtenue par la quantification chimique (leur valeur obtenue chimiquement est illustrée avec des triangles

rouges à la Figure 28). Tandis que la teneur maximale prédite en Lb des nodosités séchées avec ventilation n'atteint même pas cette teneur moyenne réelle.

### 1.2.2.3 Concentration moyenne en Lb de toutes les nodosités d'une image prédite

La mesure de la teneur moyenne en Lb de toutes les nodosités dans chaque échantillon a été prédite pour les deux types de séchages par le modèle de régression PLS 2018. Elles ont été comparées avec leur valeur réelle, obtenue chimiquement (Figure 29).

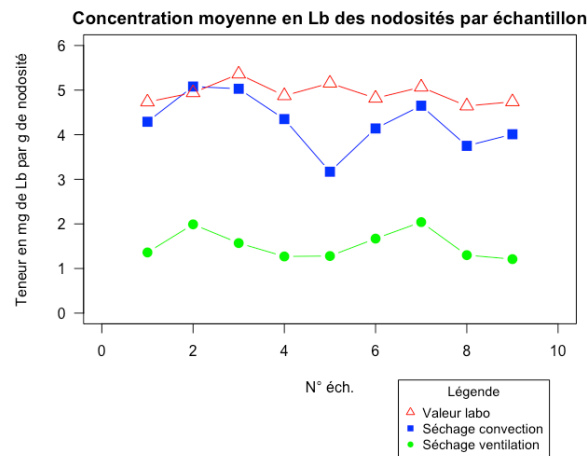


Figure 29: Représentation de la teneur en Lb moyenne réelle et prédite des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) issue d'un même ensemble de plante pour les deux types de séchages par convection et avec ventilation.

Une nette différence est observable sur la Figure 29 entre les prédictions des teneurs en Lb des nodosités issues des deux types de séchages pour les neuf échantillons. La teneur moyenne prédite en Lb des nodosités séchées avec ventilation est beaucoup plus faible que la valeur réelle obtenue lors de la quantification chimique. Tandis que les nodosités séchées par convection sont nettement mieux prédites et se rapprochent fortement de la valeur réelle obtenue en laboratoire.

Deuxièmement, il y a peu de variations observées dans la teneur en Lb des nodosités entre les échantillons. Les teneurs réelles des neuf échantillons obtenus chimiquement se situent toutes aux alentours de 5 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Cependant, cette faible variation ne permet pas de conclure sur le fait que les teneurs en Lb des nodosités séchées par ventilation ou par convection suivent la même courbe de tendance quand la teneur réelle en Lb des nodosités varie.

C'est pourquoi il est désormais intéressant de regarder si les prédictions des nodosités suivent toujours la même tendance quand les valeurs réelles en Lb des nodosités varient. Pour analyser cela, les nodosités récoltées pour la calibration du modèle de régression PLS 2018 ont été utilisées comme **référence**. Elles possèdent des teneurs qui varient au cours du temps de 3 à 6 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

### 1.2.3 Comparaison du modèle de régression PLS 2018 et 2017

Ces échantillons de nodosités de **référence** récoltés à différentes dates, et de teneurs en Lb connues, ont été prédits avec le modèle de régression PLS 2018 et le modèle de régression PLS 2017 réalisé par D. Eylenbosch *et al.* (2018a). Le modèle de régression PLS 2018 est le modèle calibré pour les nodosités séchées par convection qui a été discuté ci-dessus au point 1.1 « *Discussion de la validation du modèle de régression PLS 2018* ». Le modèle de régression PLS 2017 est un modèle créé par Damien Eylenbosch en 2017 sur des nodosités qui ont été séchées dans une étuve ventilée. Ce modèle a été créé pour des nodosités qui ont été séchées dans les mêmes conditions que les systèmes racinaires de pois récoltés lors des expérimentations de ce travail de fin d'étude.

*NB : Il est à noter que le modèle de régression PLS 2017 a été calibré sur des nodosités qui ont été cultivées en serre sous un éclairage continu et des températures contrôlées. Ces conditions expérimentales sont différentes de celles rencontrées dans les expériences de ce travail de fin d'étude.*

La représentation à la Figure 30 des échantillons de références, séchés par **convection**, montre les différences qui existent dans la prédiction de la teneur en Lb des nodosités pour les deux modèles de régression PLS 2018 et 2017. Dans les prédictions réalisées avec le modèle de régression PLS 2017, les teneurs en Lb des échantillons prédits ne semblent pas varier autant que les échantillons prédits par le modèle de régression PLS 2018, dont la teneur en Lb réelle augmente au cours du temps. L'amplitude est de 3,41 pour le modèle de régression 2018 alors qu'elle n'est que de 0,88 mg de Lb par gramme de nodosité pour le modèle PLS de régression 2017.

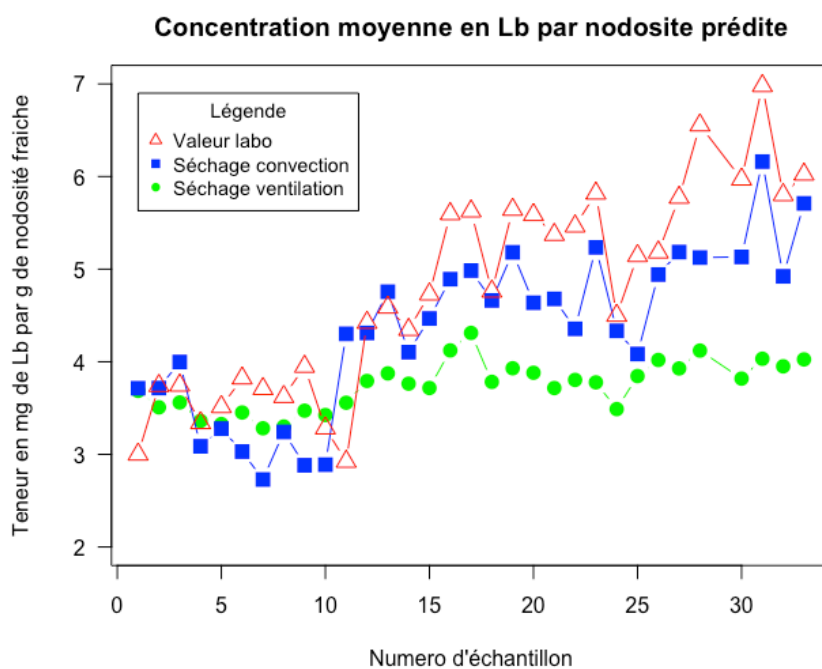


Figure 30: Représentation de la teneur moyenne en Lb des nodosités de référence, séchées par convection, qui ont été prédites par le modèle régression PLS 2018 et le modèle régression PLS 2017. La teneur en Lb réelle des nodosités mesurées chimiquement avec la méthode de la cyanméthémoglobine ( $\text{mg g}^{-1}$ ) est aussi représentée à titre de comparaison.

Toutefois, le modèle de régression PLS 2017 reconnaît bien toutes les nodosités présentes dans l'échantillon qui ont été séchées par convection. Il les prédit avec une teneur en Lb qui est positive (Tableau 1). Cette interprétation peut avoir deux significations différentes pour les nodosités séchées par convection, soit toutes les nodosités ont bien été prédites avec une teneur en Lb dans les nodosités positive, soit le modèle prédit systématiquement les nodosités positivement.

Tableau 1: Pourcentage moyen des nodosités séchées par convection qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive au sein des échantillons de référence illustré ci-dessus à la Figure 30.

Type de modèle	Pourcentage des nodosités séchées par convection qui ont été prédites avec une teneur en Lb positive (%)
Modèle de régression PLS 2018	98,88 %
Modèle de régression PLS 2017	100,00 %

Cependant, si le modèle PLS 2017 semble être moins adapté pour prédire des nodosités séchées par convection, il semble bien pouvoir prédire correctement les nodosités séchées **avec ventilation**. Le modèle de régression PLS 2017 permet d'identifier et quantifier les nodosités séchées par ventilation, alors que le modèle PLS 2018 ne permet pas de les quantifier avec une teneur en Lb positive. La Figure 31 illustre cela avec une image d'un système racinaire de pois qui a été séché par ventilation et prédite par les deux modèles.

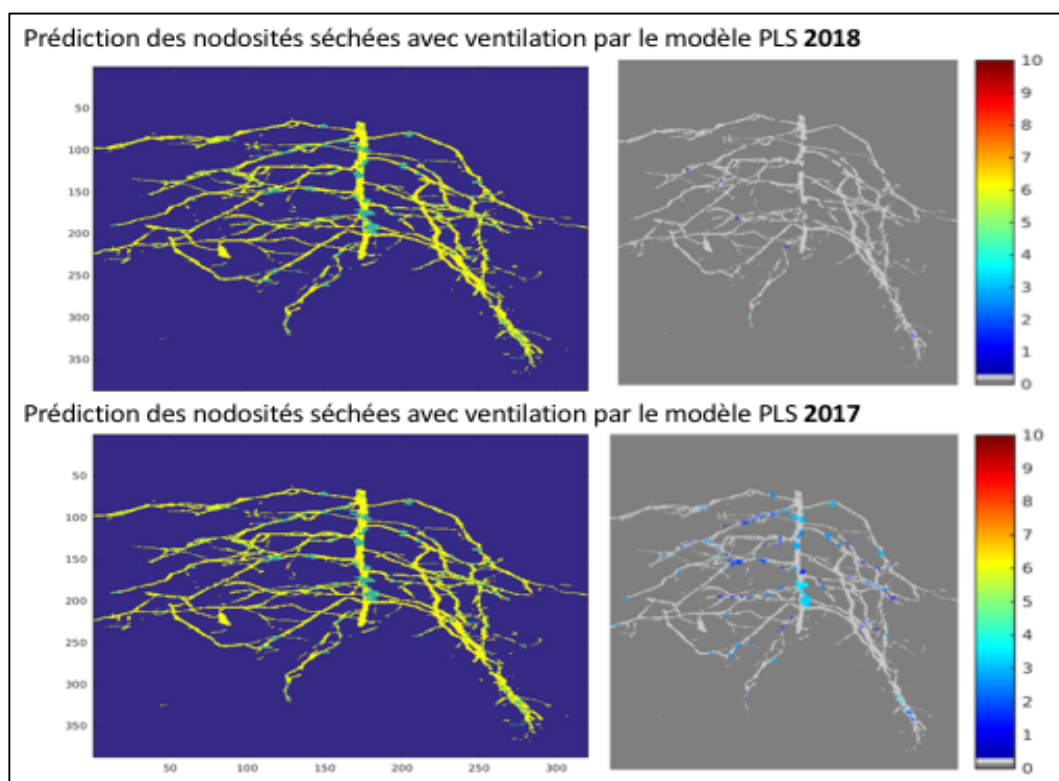


Figure 31: Illustration d'un système racinaire de pois qui a été prédit par les deux modèles de régression PLS 2018 et 2017. Les images de gauche représentent l'identification des différentes composantes sur l'image (En bleu foncé l'arrière fond, en jaune les racines de pois et en bleu ciel les nodosités). Les images de droite représentent les variations des teneurs en Lb des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) présentes sur le système racinaire du pois.

Sur base des nodosités identifiées sur les images de gauche à la Figure 31, on remarque que la quantification des nodosités séchées par ventilation par le modèle PLS 2018 lui fait défaut. Le modèle PLS 2018 n'arrive pas à prédire une teneur en Lb positive pour toutes les nodosités identifiées, alors que le pois se trouve en pleine floraison. Les teneurs en Lb des nodosités sont supposées être bien actives à cette période-là. A contrario, le modèle de régression PLS 2017 arrive à mieux quantifier les teneurs en Lb des nodosités présentes sur le système racinaire séché avec ventilation. Une variation des teneurs en Lb entre les nodosités est même observable sur la Figure 31. Cependant la valeur maximale des nodosités prédites semble stagner autour de 4-5 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches et ne dépasse pas la teneur moyenne réelle d'une nodosité (Figure 32). Le modèle de régression PLS 2017 semblerait montrer des limites de quantification dans les prédictions des teneurs en Lb des nodosités du pois.

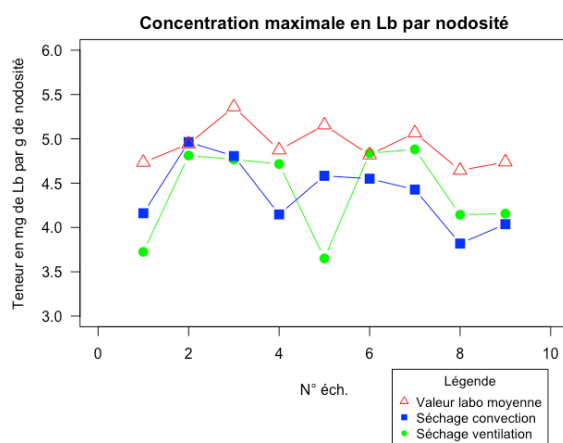


Figure 32: Représentation de la teneur en Lb moyenne réelle et maximale prédite des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) issue d'un même ensemble de plantes pour les deux types de séchages par convection et avec ventilation. Les prédictions ont été réalisées par le modèle de régression PLS 2017.

### 1.3 Discussion des résultats

De manière générale, il s'avère que le modèle de régression PLS 2018 soit adapté pour prédire la teneur en Lb des nodosités de pois qui ont été séchées par convection. Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour la calibration du modèle affiche une valeur de 0,72. Ce coefficient indique le pourcentage de la variance de la teneur en Lb des nodosités prédites qui est prise en compte par la teneur en Lb des nodosités mesurées. Selon Saeys, Mouazen et Ramon (2005), une valeur pour un  $R^2$  comprise entre 0,66 et 0,81 indique que les prédictions quantitatives sont alors qualifiées d'approximatives. De plus, son erreur quadratique moyenne de 0,70 peut être considérée comme n'étant pas trop élevée dans une approche quantitative étant donné que le modèle a été calibré pour des teneurs en Lb des nodosités qui varient entre 3 et 7 mg par gramme de nodosités fraîches.

Le modèle de régression PLS 2018 semble être robuste pour la quantification des teneurs en Lb des nodosités se trouvant dans une gamme qui varie de 3 à 7 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Cependant, pour des valeurs plus faibles, le carré des écarts entre leurs

prédictions et leurs observations réelles est plus important que la moyenne du carré des écarts des autres échantillons avec une teneur en Lb par gramme de nodosités fraîches qui varie de 3 à 7 mg de Lb.

Deuxièmement, le modèle de régression PLS 2018 n'est pas approprié pour la quantification des nodosités séchées par ventilation. En effet, il ne prédit pas toutes les nodosités avec une valeur positive, alors qu'elles sont censées être très actives à la floraison. De plus, leur valeur maximale stagne aux alentours de 4 mg de Lb par gramme de nodosités et leur teneur en Lb moyenne dans les nodosités ne semble pas évoluer au cours du temps.

La différence de séchage induit des différences physico-chimiques dans les nodosités. Une différence visuelle existe entre les deux types de séchages. Les nodosités séchées par convection sont de couleur plus vive que les nodosités séchées par ventilation. De plus, des différences spectrales sont aussi observées entre les deux types de séchages des nodosités et expliqueraient donc les différences dans la prédiction des teneurs en Lb des nodosités pour les deux modèles de régression PLS 2017 et 2018. Le type de séchage induirait-il une dégradation de la Lb, ou juste des modifications physico-chimiques qui ne sont pas en lien avec la Lb ?

Enfin, afin de pouvoir tout de même quantifier la teneur en Lb des nodosités présentes sur les systèmes racinaires du pois, le modèle de régression PLS 2017 de Damien Eylembosch *et al.* (2018a) a été analysé. Celui-ci a été calibré sur des nodosités séchées par ventilation. Comparé au modèle de régression PLS 2018, le modèle de régression PLS 2017 prédit les nodosités positivement avec des variations dans les teneurs en Lb des nodosités séchées par ventilation. Cependant, la quantification plafonne à une teneur de 4-5 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Les mesures ne semblent donc pas être exactes à 100 % d'un point de vue quantitatif. Toutefois les mesures permettront tout de même de comparer les teneurs en Lb des échantillons racinaires qui ont été séchés par ventilation. Les nodosités prédites fournissent de l'information semi-quantitative et qualitative qui exprime l'activité de la fixation symbiotique au sein des nodosités.

## 2 Evolution de la teneur en Lb des nodosités dans le temps

### 2.1 L'évolution de la teneur en Lb des nodosités dans l'espace et le temps.

Afin de déterminer l'évolution de la teneur en leghémoglobine des nodosités au cours du temps, plusieurs systèmes racinaires de la culture du pois d'hiver ont été suivis dès le mois de février et ce jusqu'au mois de mai, peu après leur floraison. Trois mesures ont été prédites par le modèle de régression PLS 2017 sur les nodosités du système racinaire de chaque plante (Figure 33) :

1. La teneur moyenne prédite en Lb des nodosités identifiées sur l'image hyperspectrale ;
2. La teneur maximale et minimale en Lb prédite d'une nodosité parmi toutes les nodosités identifiées sur l'image hyperspectrale.

### 2.1.1 La teneur moyenne en Lb (mg g<sup>-1</sup>) des nodosités au cours du temps

A la sortie de l'hiver, l'activité fixatrice symbiotique moyenne de l'azote dans toutes les nodosités d'un plant de pois s'active petit à petit (Figure 33.I). Les teneurs moyennes prédites en Lb des nodosités ne sont significativement pas différentes pour les premières dates (p-valeur < 0.001). Ensuite, l'activité symbiotique augmente brusquement et se stabilise lors de la floraison, début mai. L'analyse de la variance met en évidence l'apparition d'un plateau début mai à la floraison, où les teneurs moyennes en Lb des nodosités ne sont pas significativement différentes.

### 2.1.2 La teneur moyenne minimale en Lb d'une nodosité au cours du temps

Selon l'analyse de la variance, la teneur minimale moyenne d'une nodosité observée sur le système racinaire est significativement non différente pour les différentes dates qui ont été recensées de février jusqu'au début de la floraison de la culture (Figure 33.II).

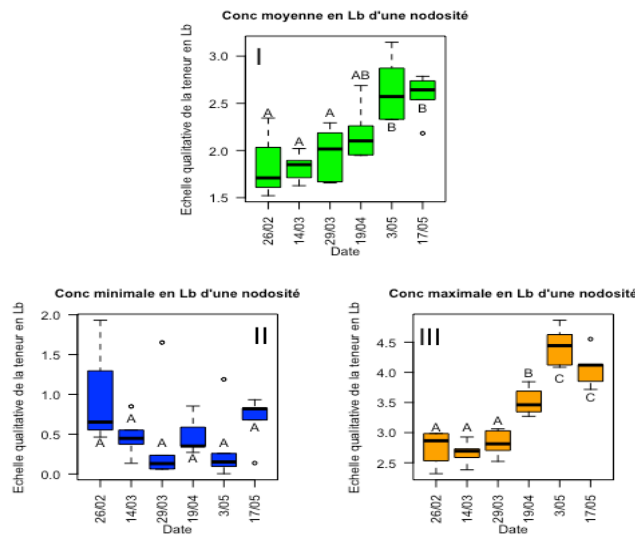


Figure 33: L'évolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités présentes sur toute l'image acquise (I), de la teneur minimale en Lb d'une nodosité (II) et la teneur maximale en Lb d'une nodosité au cours du temps (III).

### 2.1.3 La teneur moyenne maximale en Lb d'une nodosité au cours du temps

La Figure 33.III affiche une même tendance que la Figure 33.I pour l'évolution de la teneur maximale en Lb prédite des nodosités. Les teneurs maximales augmentent et sont significativement différentes lors du développement de la culture (p-valeur < 0.001). À la sortie de l'hiver, les teneurs maximales sont à leurs niveaux les plus bas et non significativement différentes pour les premiers mois. Ensuite la teneur en Lb augmente exponentiellement pour arriver à son pic lors de floraison. Là aussi, l'analyse de la variance ne met aucune différence significative en évidence pour la teneur maximale en Lb des nodosités aux différentes dates de floraison début mai.

### 2.1.4 Discussion des résultats

De manière générale, une augmentation de la teneur moyenne en Lb des nodosités est observée à la sortie de l'hiver dans le cas du pois d'hiver pour arriver à son apogée à la floraison. L'utilisation du modèle de régression PLS 2017 n'a pas pu prédire précisément la teneur en Lb au sein des nodosités comme il a été décrit dans le premier chapitre. Toutefois sur base des mesures qualitatives et semi-quantitatives, la fixation symbiotique de l'azote, exprimée par la teneur en Lb des nodosités, met un peu de temps à augmenter à la sortie de l'hiver. Ensuite, elle commence à augmenter exponentiellement jusqu'à la floraison où là, elle semble se stabiliser et stagner.

De plus, la teneur minimale en Lb des nodosités qui a été prédite au cours du temps ne semble pas se différencier significativement au cours des semaines. La cause serait l'apparition de nouvelles nodosités qui émergent plus tardivement sur le système racinaire au cours de la croissance végétative de la plante. Tricot et al. (1994) indiquait que l'apparition des nodosités sur les racines latérales à l'échelle de la plante est décalée dans le temps et que les nodosités arrivaient déjà au stade « 6 feuilles » de la plante.

## 2.2 Comparaison de l'évolution de la teneur en leghémoglobine (Lb) entre le pois d'hiver et de printemps avant et après la floraison.

### 2.2.1 Evolution de la teneur en leghémoglobine des deux cultures de pois

La quantification chimique de la teneur en Lb des nodosités, obtenue par la méthode de la cyanméthémoglobine, a permis de représenter l'évolution de la teneur en Lb des nodosités pour deux différentes cultures de pois. Les pois d'hiver et de printemps ont été analysés et comparés pendant les semaines qui précédaient et suivaient leur floraison (Figure 34).

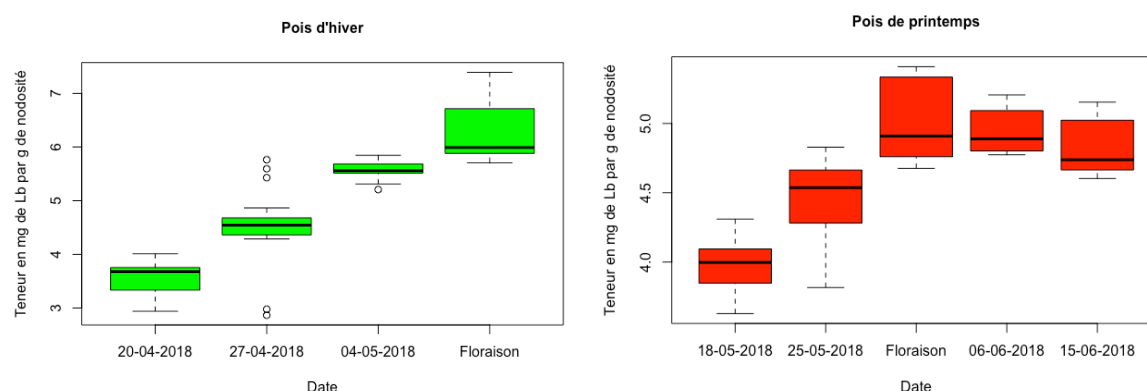


Figure 34: L'évolution hebdomadaire de la leghémoglobine (Lb) pour le pois d'hiver (à gauche) et le pois de printemps (à droite) avant ou après la floraison.

De manière générale, une nette augmentation de la teneur en leghémoglobine est observable pour les deux cultures jusqu'à leur floraison. L'analyse de la variance montre qu'il existe des différences très hautement significatives ( $p$ -valeur  $< 0.001$ ) pour les semaines qui précèdent la floraison. La teneur en leghémoglobine a ensuite tendance à se stabiliser lors de la floraison



dans les nodosités de pois de printemps. Aucune différence significative n'est observable par la suite au cours de la floraison jusqu'au 15 juin 2018 (stade «3 étages florifères») (Tableau 2).

Tableau 2 : La teneur moyenne en leghémoglobine des nodosités (mg par g de nodosités fraîches) du pois d'hiver et de printemps mesurée à plusieurs semaines d'intervalles avant et après la floraison. Cette teneur a été obtenue chimiquement grâce à la méthode de la cyanméthémoglobine.

Teneur en Lb des nodosités (mg g <sup>-1</sup> ) obtenue chimiquement						
		Pois d'hiver			Pois de printemps	
Date	Moyenne		Std	Moyenne		Std
Semaine -3	3,57 (a)	A	0,29	-	-	-
Semaine -2	4,52 (b)	B	0,75	3,97 (a)	A	0,20
Semaine -1	5,58 (c)	C	0,18	4,46 (b)	B	0,30
Floraison	6,23 (d)	D	0,55	5,01 (c)	C	0,30
Semaine +1	-	-	-	4,95 (c)	C	0,17
Semaine +2	-	-	-	4,83 (c)	C	0,21

### 2.2.2 Comparaison de la teneur en Lb au stade « début de floraison » entre les deux cultures de pois

Dans l'analyse des deux différentes cultures de pois, certaines tendances identiques sont observables. Premièrement, la teneur maximale en Lb des nodosités s'atteint aussi bien pour le pois d'hiver que pour le pois de printemps à la floraison (base 0) (Figure 35). De plus, l'augmentation de la teneur en Lb des nodosités est importante dans les semaines qui précèdent la floraison de la plante.

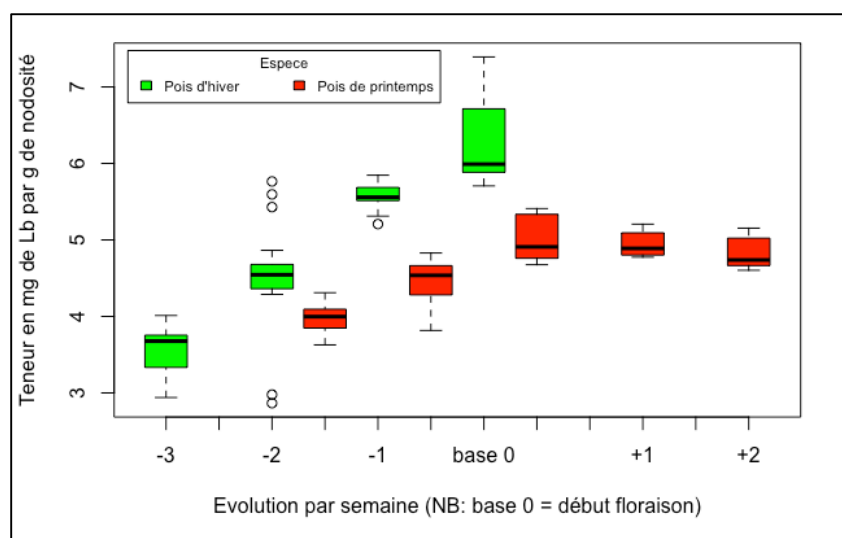


Figure 35: Comparaison de l'évolution hebdomadaire de la teneur en leghémoglobine (Lb) des nodosités du pois de printemps et d'hiver avant et après la floraison (semaine -1 correspond à la semaine qui précède la floraison, semaine +1 correspond à la semaine qui suit la floraison).

Il est à noter qu'une différence significative entre les teneurs des deux cultures de pois (hiver et printemps) est présente à leur floraison. Cependant, les cultures ont été cultivées dans des

conditions expérimentales complètement différentes. L'apparition de leurs stades phénologiques ne coïncident pas non plus étant donné que l'une est une culture d'hiver semée en novembre et l'autre une culture de printemps semée au printemps. Il serait donc trop imprudent de tirer des conclusions sur cette différence significative entre les teneurs en Lb des nodosités des deux cultures à la floraison.

### 2.2.3 Discussion des résultats

Globalement, une évolution de la teneur en Lb est observée au cours du temps pour la culture de pois d'hiver et de printemps. Cette tendance est identique pour les deux cultures. La teneur en Lb des nodosités augmente de façon importante lors des semaines qui précèdent la floraison. Les nodosités atteignent une teneur maximale en Lb à la floraison. Par conséquent, l'activité fixatrice de l'azote arrive à son pic de fonctionnement à cette période-là. Ensuite, l'activité fixatrice de l'azote semble se maintenir stable au cours de la floraison de la plante.

Silsbury (1990) remarqua aussi une évolution de l'activité fixatrice de l'azote au cours du temps. Celle-ci augmente jusqu'au début de la floraison pour ensuite stagner et chuter au début du remplissage des grains. L'activité fixatrice de l'azote reste importante jusqu'au remplissage des grains, à partir duquel les besoins en azote et en carbones pour la graine deviennent plus importants. La relocalisation de l'azote des parties végétatives vers les organes reproducteurs et les besoins plus accrus de la graine en photosynthétat<sup>11</sup>, issus de la photosynthèse, seraient à l'origine de l'entrée en sénescence des nodosités et par conséquent de la baisse de l'activité symbiotique fixatrice de l'azote.

Cette dernière phase n'a pas pu être représentée dans les observations ci-dessus mais sera illustrée dans les autres expériences, lors des prochains chapitres, où une baisse de l'activité symbiotique de l'azote est enregistrée lors du remplissage des graines du pois.

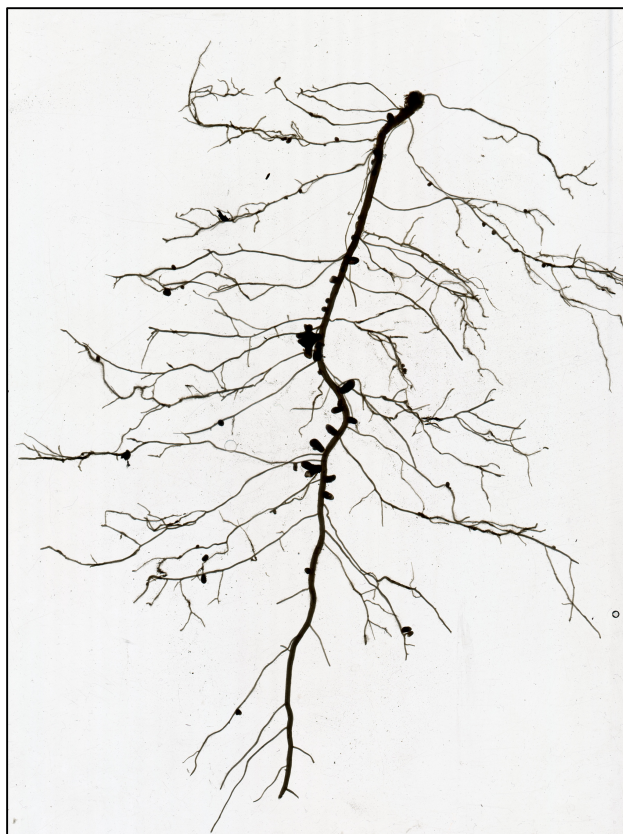
## 2.3 Répartition des nodosités et de leur teneur en Lb sur un système racinaire complet.

### 2.3.1 Représentation dans le temps des nodosités et leurs teneurs en Lb

La répartition des nodosités sur le système racinaire des pois d'hiver apparaît de manière échelonnée dans le temps. Elles apparaissent premièrement sur la racine principale et ensuite sur les racines latérales de premier ordre. La Figure 36 met bien en évidence la présence de nodosités « secondaires » qui se trouvent sur les racines latérales de premier ordre. Leur taille est plus petite par le fait qu'elles se sont développées sur les racines latérales qui ont émergé plus tardivement.

---

<sup>11</sup> Photosynthétat est une partie de la sève transportée dans les tiges des plantes vasculaires, il est composé d'hydrates de carbone et d'autres sous-produits issus de la photosynthèse chlorophyllienne.



*Figure 36: Répartition des nodosités sur le système racinaire d'une plante de pois qui a été scannée début mai, une semaine avant le début de floraison de la culture.*

Un suivi du système racinaire au moyen d'un scan a permis de suivre leur développement jusqu'au début de la floraison de la culture. Le 16 février 2018, 405 degrés-jours après le semis au stade « 4 feuilles », les nodosités sur la racine principale étaient déjà présentes et développées de couleurs blanches. L'émergence des premières nodosités « secondaires » ont été observées sur les racines latérales de premier ordre le 12 mars 2018, au stade « 6 feuilles », 480 degrés-jours après la date de semis. Les racines latérales de second ordre émergeaient aussi au même moment. La couleur rosâtre typique de la leghémoglobine commençait aussi à s'observer sur les nodosités primaires sur la racine principale. Ensuite, les nodosités secondaires et primaires ont continué à se développer. Il est à noter que jusqu'au 5 mai 2018, avant le début de floraison, les nodosités « primaires » possédaient une taille toujours plus importante que les nodosités « secondaires » (Illustrations de quelques images scannées en annexe).

Deuxièmement, la représentation à la Figure 37 met en évidence l'apparition progressive des teneurs en Lb des nodosités sur le système racinaire du pois grâce à la présence de points colorés. La couleur varie en fonction la teneur en Lb des nodosités. Les deux dates représentent la sortie de l'hiver de la plante de pois au stade végétatif « 6 feuilles » et en début de floraison.

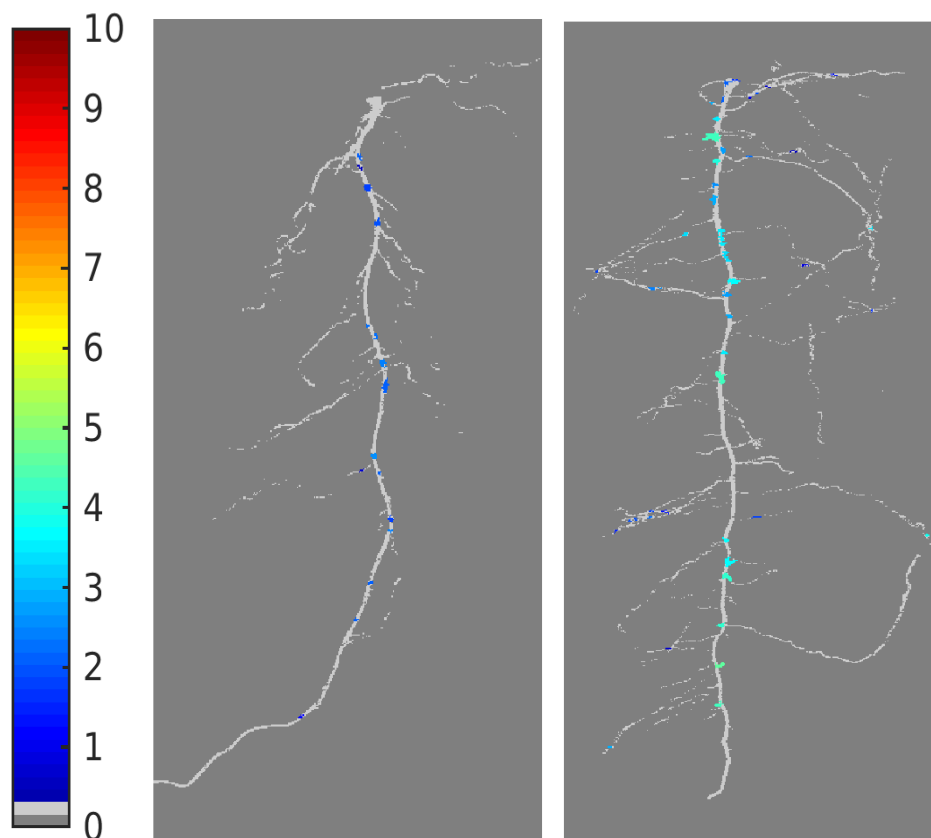


Figure 37: Représentation des variations de teneurs en Lb des nodosités ( $\text{mg g}^{-1}$ ) sur un système racinaire de pois d'hiver provenant de la même parcelle lors de deux dates différentes: le 14 mars 2018 – stade 6 feuilles (à gauche) et le 3 mai 2018 - stade "début floraison" (à droite). L'échelle de couleur exprime la teneur en Lb des nodosités en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

Les différentes couleurs mettent en évidence les écarts des teneurs en Lb des nodosités. A la sortie de l'hiver, au mois de mars, les nodosités apparaissent toutes bleu foncé sur la racine principale de la plante. Celles-ci ne possèdent pas ou peu de Lb. De plus, les nodosités semblent aussi se retrouver dans une même catégorie avec des teneurs qui varient entre 0 et 3 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

Par contre, à la floraison, les couleurs des nodosités sont beaucoup plus vives et variées. Elles expriment une teneur en Lb plus importante qui varie entre 0 et 5 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. Des nodosités de toutes catégories sont présentes sur la racine principale de la plante. Les nodosités de type « secondaires » apparaissent aussi sur les racines latérales de premier ordre de la plante. Leur couleur est plutôt bleuâtre et exprime donc une teneur en leghémoglobine plus faible que les nodosités présentes sur la racine principale de la plante.

### 2.3.2 La comparaison des teneurs en Lb des nodosités primaires et secondaires

L'apparition des nodosités se fait initialement sur la racine principale et seulement plus tard sur les racines latérales de premier ordre, comme il a été illustré dans les paragraphes précédents. Leur apparition plus tardive s'explique par le fait que les racines latérales doivent d'abord se développer avant d'être infectées par les bactéries symbiotiques et donc engendrent un retard dans leur développement au fil du temps.

Afin d'illustrer cela, les teneurs en Lb des nodosités « primaires » présentes sur le pivot de la plante et les teneurs en Lb des nodosités « secondaires » présentes sur les racines latérales de la plante ont été comparées entre-elles. Les nodosités ont été classées comme nodosités « primaires » et « secondaires » en fonction d'où elles se situaient sur le système racinaire. Leur teneur a ensuite été mesurée chimiquement par la méthode de la cyanméthémoglobine.

Sur la Figure 38, l'évolution de la teneur en Lb de nodosités issues des racines principales et des racines latérales a été mise en évidence. La teneur des nodosités « primaires » n'évolue plus à partir du moment où elle rentre en floraison. Tandis que la teneur des nodosités présentes sur les racines latérales est légèrement retardée. Celle-ci augmente encore pendant la floraison jusqu'à arriver à un plafond comme les nodosités principales. L'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les nodosités primaires et les nodosités secondaires pour les deux premières dates ( $p$ -valeur < 0.001). Cependant, pour la dernière date aucune différence significative n'est observable.

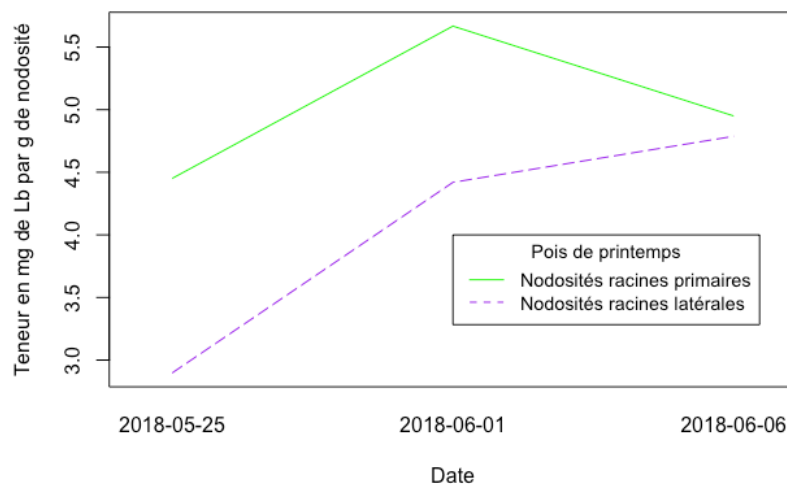


Figure 38: Evolution de la teneur en leghémoglobine des nodosités fraîches ( $\text{mg g}^{-1}$ ) se trouvant sur la racine primaire ou sur les racines latérales dans la culture du pois de printemps.

### 2.3.3 Discussion des résultats

Dans ce chapitre, il a été mis en évidence que les teneurs en Lb des nodosités varient au cours du temps et apparaissent de manière échelonnée sur le système racinaire de la plante. L'intensité des teneurs en Lb des nodosités n'est pas identique sur tout le système racinaire de la plante. De plus, les nodosités apparaissent initialement sur la racine principale de la plante. Ensuite, durant la période de développement des nodosités « primaires », des nodosités secondaires apparaissent aussi sur les racines latérales de premier ordre. Ces nodosités secondaires possèdent une teneur en Lb plus faible mais qui tend vite à augmenter, jusqu'à avoir une teneur en Lb équivalente à celle des nodosités primaires. Les nodosités « secondaires » arrivent au cours de la floraison à leur pic de production pour suppléer les nodosités « primaires » qui devraient entrer en phase de sénescence plus rapidement que les nodosités secondaires.

Selon Tricot et al. (1994), les premières nodosités sont déjà visibles à partir du stade deux feuilles. Elles apparaissent initialement sur le pivot de la racine et émergent ensuite au stade « 6 feuilles » sur les racines latérales au cours de la croissance végétative de la plante. De plus, il remarqua aussi une hétérogénéité au niveau de l'âge des nodosités, qui se traduit par leur taille et leur couleur typiquement rosâtre. Crozat *et al.* (1991) cité par Tricot et al. (1994) a mis en évidence une corrélation en début de floraison entre la masse des nodosités et l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) qui exprime l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique.

Celle-ci expliquerait les différentes teneurs observées entre les nodosités « primaire » sur un système racinaire, étant donné que leur taille n'est pas toujours identique. Ensuite en début de culture les nodosités « secondaires » possèdent des teneurs en Lb plus faibles par le fait qu'elles apparaissent plus tardivement. A l'approche de la floraison, les teneurs des nodosités en Lb, exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches, ne semblent plus se différencier significativement. Cependant, les nodosités secondaires possèdent une taille individuelle moins importante et donc elles fixeraient moins d'azote atmosphérique au niveau sa structure symbiotique.

### 3 La fixation symbiotique de l'azote chez les différentes variétés de pois d'hiver

#### 3.1 Introduction

Dans la parcelle « Pois d'hiver », la fixation symbiotique de l'azote a été suivie sur quatre variétés de pois d'hiver (Gangster, Fresnel, Myster et Furious) jusqu'au début de leur floraison. Les teneurs en Lb des nodosités, récoltées sur la racine principale de la plante et séchées par convection ont été prédites par le modèle de régression PLS 2018. Cependant, la variété « Gangster » n'a pu être analysée. Cette variété a été utilisée pour rendre le modèle de régression PLS 2018 plus robuste pour de plus faibles teneurs en Lb.

Plusieurs difficultés ont été rencontrées sur cette parcelle causant un développement non optimal de la culture. Le suivi de la parcelle a été interrompu dès la floraison de la culture, après la constatation d'une densité de larves de sitones trop importante dans les nodosités « primaires » de la plante. Les larves détruisaient le contenu des nodosités empêchant le bon développement de la plante et le prélèvement des nodosités.

#### 3.2 Interprétation des résultats

##### 3.2.1 Teneur en Lb moyenne d'une nodosité au cours du temps

L'analyse de la variance a montré qu'il existait une interaction très hautement significative entre les dates et les variétés pour les teneurs moyennes en Lb des nodosités de pois d'hiver pour la parcelle étudiée ( $p$ -valeur < 0.001). Afin d'illustrer ces différences, la teneur en Lb des trois variétés (Fresnel, Myster et Furious) a été analysée pour chaque date de prélèvement.

Sur la Figure 39 la teneur en Lb moyenne des nodosités pour chaque variété est illustrée pour les deux premières dates, qui correspondent au stade « 5 feuilles » et « 7 feuilles » de la plante.

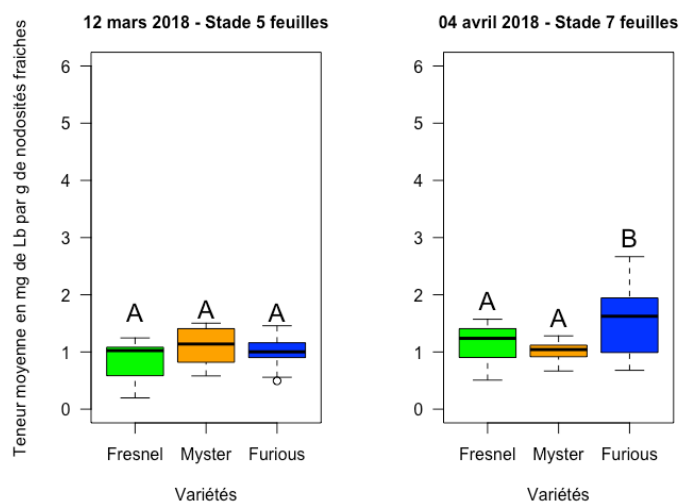


Figure 39: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités pour les variétés (Fresnel, Myster et Furious) aux stades 5 feuilles et 7 feuilles.

Les teneurs en Lb des nodosités pour les différentes variétés ne sont pas significativement différentes pour la date du premier prélèvement, le 12 mars 2018. Ensuite, la teneur en Lb des nodosités de chaque variété augmente très légèrement jusqu'au « stade 7 feuilles ». A ce stade, une différence significative ( $p$ -valeur  $< 0.05$ ) est observée pour la variété Furious, où la teneur moyenne en Lb se distingue des deux autres variétés.

Au fur et à mesure de l'avancement de la saison culturale de la culture, la teneur en Lb des nodosités des variétés continue à augmenter (Figure 40).

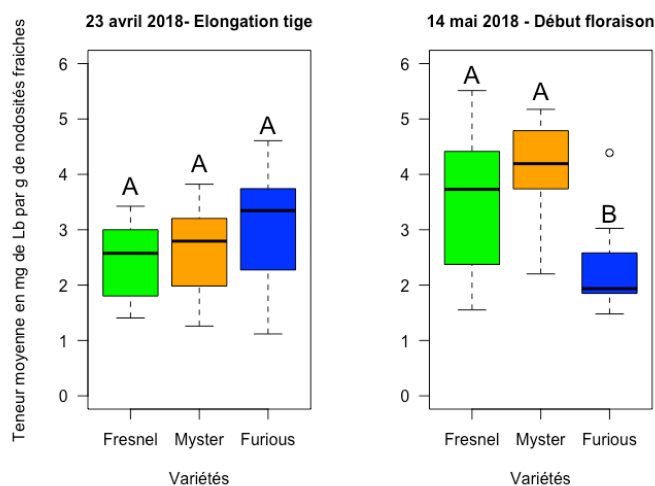


Figure 40: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités pour les variétés (Fresnel, Myster et Furious) aux stades élancement de la tige principale et en début de floraison.

Cependant, même si la teneur moyenne en Lb des nodosités de la variété Furious est plus élevée que les deux autres variétés Fresnel et Myster le 23 avril 2018, elle ne se différencie toutefois plus significativement. Sa teneur a même tendance à chuter juste avant d'arriver en

début de floraison. Cette baisse résulte sans doute de la présence de larves sitones, qui ont été recensées dans les nodosités au moment du prélèvement. Le développement plus rapide de l'activité symbiotique de l'azote chez la variété Furious a peut-être dû jouer un rôle dans une ponte plus précoce des sitones adultes dans les nodosités « primaires ». Il aurait été intéressant de suivre l'évolution des autres variétés par la suite pour avoir une confirmation, puisqu'elles étaient aussi infectées.

### 3.2.2 Evolution de la teneur maximale en Lb des nodosités

Dans le suivi des variétés, la teneur maximale en Lb des nodosités ne semble pas se différencier significativement, à l'exception de la dernière date pour la variété Furious. Tout comme la teneur moyenne en Lb des nodosités, la teneur maximale en Lb des nodosités chute brusquement (Figure 41).

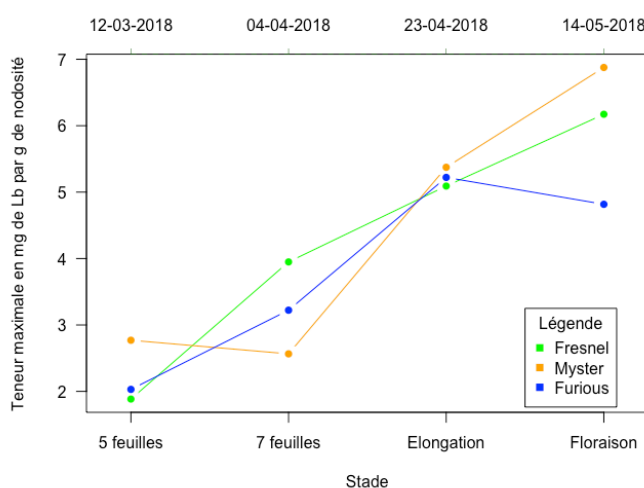


Figure 41: Evolution de la teneur maximale en Lb des nodosités pour les trois variétés (Fresnel, Myster et Furious) pour les différentes dates.

En regardant l'évolution des teneurs maximales moyennes en Lb des nodosités pour les différentes variétés aux différentes dates, on remarque que la variété Fresnel possède une teneur un peu plus élevée le 4 avril 2018, au stade « 7 feuilles ». Cette variété est caractérisée comme ayant une floraison précoce et entre donc quelques jours plus tôt en floraison que les autres variétés. A contrario, la variété Myster, caractérisée avec une floraison demi-tardive, possède une teneur maximale en Lb qui met un peu plus de temps à augmenter. La variété Furious, avec une floraison semi-précoce, se retrouve entre les deux variétés Myster et Fresnel.

A l'approche de la floraison, les teneurs en Lb des nodosités atteignent des valeurs qui varient entre 4 et 7 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches. La présence de sitones dans les nodosités a dû jouer un rôle sur la valeur qui a été obtenue, il est donc difficile de tirer une conclusion pour la valeur maximale en Lb des nodosités à la floraison.



### 3.2.3 Evolution du nombre de nodosités dans les premiers centimètres du sol sur le système racinaire de différentes variétés

La seconde observation qui a été enregistrée dans la parcelle « pois d'hiver » est le nombre de nodosités « primaires » présentes sur la racine principale dans les 15-20 premiers centimètres du sol.

Un comptage des nodosités a été réalisé sur les dix premiers centimètres de la racine et ensuite sur le reste de la racine. Etant donné que la longueur racinaire des nodosités variait lors de chaque prélèvement, il a été plus judicieux d'exprimer le nombre de nodosités par centimètre de racine extraite du sol.

Dans le Tableau 3 ci-dessous, la densité de nodosités présente sur chaque centimètre racinaire n'évolue pas significativement au cours du temps à l'exception de la première date. Cette exception s'explique par une différence d'échantillonnage. Lors des premiers prélèvements, le matériel utilisé en début d'expérience ne permettait pas de mesurer des longueurs racinaires qui excédaient 15 cm. Alors que, par la suite, les longueurs racinaires mesurées allaient jusqu'à 20 cm, et parfois même 25 cm.

A la dernière date, une légère diminution est observée. Elle est le reflet de l'apparition des larves de sitones dans les nodosités qui les détruisaient et induisait donc des erreurs de comptages.

Tableau 3: Evolution du nombre de nodosités par cm de racine pour les quatre variétés (Fresnel, Myster et Furious) jusqu'à leur floraison.

Nombre de nodosités moyen par cm de racine						
Variétés						
Dates	1 - Fresnel		2 - Myster		3 - Furious	
12-03-18	3.235	B	2.250	B	1.757	B
04-04-18	2.407	A	2.078	A	1.373	A
23-04-18	2.578	A	1.888	A	1.496	A
14-05-18	2.672	A	1.9073	A	1.206	A

L'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative ( $p$ -valeur < 0.001) entre la densité de nodosités « primaires », présentes sur les **10 premiers cm du sol**, et la densité de nodosités présentes dans l'horizon qui suit, **de 10 à 25 cm**. La densité moyenne des nodosités par cm de racine dans les 10 premiers centimètres du sol était 2 fois plus importante que la densité de nodosités dans l'horizon plus bas, de 10 à 25 cm (Tableau 4). Ceci expliquerait donc pourquoi la densité de nodosités par cm de racine fut plus importante pour la première date. La densité de nodosités, plus importante dans les premiers centimètres de l'horizon, a donc induit un biais dans la moyenne finale de la première date, où le système racinaire n'excédait pas les 15 cm.

Tableau 4: Comparaison de la densité de nodosités par cm de racine pour deux horizons dans le sol. L'horizon 1 constitue les dix premiers cm du sol et l'horizon 2 les cm restant de la racine qui peut mesurer 25 cm maximum.

La densité de nodosités présente dans les différents horizons de sol		
Horizons	Densité moyenne de nodosités par cm de racine (nbr/cm)	Std
Horizon 1 : 0-10 cm	2.07	A 0.76
Horizon 2 : 11-25cm	0.97	B 0.78

Cependant, si la densité de nodosités par cm de racine n'évolue pas au cours du temps, des différences entre variétés sont toutefois observables à la Figure 42 ci-dessous.

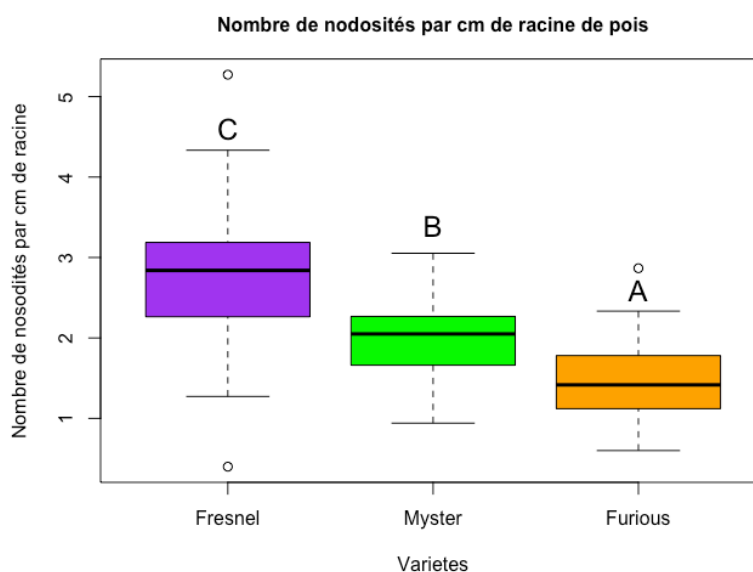


Figure 42: La densité de nodosités par centimètre de racine pour les différentes variétés sur l'entièreté du système racinaire.

L'analyse de la variance met en évidence des différences très hautement significatives ( $p$ -valeur  $< 0.001$ ) entre les densités de nodosités par centimètre de racine pour les différentes variétés. La variété Fresnel possède la densité de nodosités la plus importante avec 2,73 nodosités par cm de racine. Elle est suivie par la variété Myster avec 2,02 nodosités par cm racinaire. Ensuite, en bas du classement se trouve la variété Furious avec respectivement une densité de nodosités par cm de racine de 1,46.

### 3.3 Discussion des résultats

Globalement, il a été mis en évidence dans ce chapitre que les teneurs en Lb des nodosités « primaires » ne se différencient pas de manière hautement significative entre les différentes variétés. A l'exception de la variété Furious qui est une variété caractérisée par une floraison précoce, la teneur moyenne en Lb dans les autres variétés semble être identique. La teneur maximale en Lb des nodosités ne se différencie pas non plus significativement. Cependant,

l'observation des sitones au moment de la floraison a sans aucun doute dû induire une perturbation dans la teneur des Lb qui empêche de tirer des conclusions claires sur l'activité fixatrice de l'azote entre les variétés lors de la floraison.

Par ailleurs, le nombre de nodosités présentes sur le système racinaire n'est pas identique pour toutes les variétés. La variété Fresnel sort du lot et possède une densité de nodosités par centimètre de racine la plus importante. Elle est suivie par la variété Myster, qui se distingue elle-même de la variété Furious. Selon Tricot et al. (1994), le nombre de nodosités présentes sur la racine principale est déterminé, et celles-ci sont alimentées par les réserves de la graine en début de croissance du système racinaire. Les nodosités se développent avant que la plante ne rentre en autotrophie. Cependant, lors du passage de la plante de l'hétérotrophie à l'autotrophie, la vitesse d'élongation racinaire est diminuée et se traduit par une baisse d'apparition de nodosités sur ce segment racinaire. Ceci permet d'expliquer pourquoi la densité de nodosités par cm de racines serait plus élevée pour le premier horizon (0 à 10 cm) que le second horizon (10 à 25 cm).

Il a été démontré que la teneur moyenne en Lb des nodosités, exprimée en mg de Lb par gramme de nodosités fraîches, est globalement significativement identique au sein des différentes variétés au cours de leur développement. L'activité fixatrice de l'azote est donc considérée comme étant identique au niveau des nodosités des différentes variétés. Cependant, la densité de nodosités par cm de racine est plus élevée pour les variétés Fresnel et Myster. Ces variétés permettent donc de fixer plus d'azote à l'échelle de la plante pour les nodosités « primaires », pour autant que leurs masses soient identiques. Car Crozat *et al.* (1991), cité par Tricot et al. (1994), a mis en évidence une corrélation à la floraison de la culture entre la masse des nodosités et l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) qui exprime l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique. Donc plus la masse d'une nodosité est importante, au plus sa capacité à fixer de l'azote sera importante à l'échelle de la nodosité. Pour conclure, la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique semblerait être plus importante pour la variété Fresnel dans les nodosités primaires.

Il est à noter que seules les nodosités primaires ont été analysées et donc aucune conclusion ne peut être faite sur les nodosités secondaires.

**Remarque générale :**

*Dans les prochains chapitres, les teneurs en Lb des nodosités ont été prédites par le modèle de régression PLS 2017 établi par D. Eylenbosch et al. (2018a). Ce modèle a été introduit dans le premier chapitre. Il a été construit et calibré sur base de nodosités, séchées par ventilation, qui ont été cultivées dans des conditions expérimentales sous serres, différentes de celles rencontrées en champs. Cependant, ce modèle a tout de même été utilisé pour prédire les nodosités récoltées qui ont été séchées dans de mêmes conditions que les racines récoltées aux cours des expériences. Les teneurs prédites offrent donc une mesure qui est qualitative et semi-quantitative.*

## 4 La fixation symbiotique de l'azote de la culture de pois en association avec du froment

### 4.1 Introduction

Dans la deuxième expérience, l'activité fixatrice symbiotique de l'azote a été analysée entre une culture en association de pois et de froment et une culture de pois pure. Les deux cultures ont été semées le 15 novembre 2017.

Trois prélèvements ont été réalisés lors de la période culturale :

1. Peu avant la floraison de la culture du pois et au stade BBCH 31 du froment ;
2. En cours de floraison de la culture du pois et au stade BBCH 39 du froment ;
3. Et à la fin du remplissage de la culture du pois et au stade BBCH 73 du froment.

Les teneurs en Lb des nodosités séchées par ventilation ont été prédites avec le modèle de régression PLS 2017, qui a été décrit dans le chapitre 1.

### 4.2 Interprétation des résultats

#### 4.2.1 Teneur moyenne en Lb des nodosités

Concernant la teneur en Lb moyenne des nodosités pour les deux types de cultures, l'analyse de la variance met en évidence des différences significatives pour les différentes dates de prélèvements. La teneur maximale pour les deux types de cultures a été enregistrée le 21 mai 2018, lors de la floraison. L'analyse de la variance ne différencie cependant pas significativement la teneur moyenne en Lb des nodosités entre les deux types de cultures (pois association et pois pur) pour les deux premières dates de prélèvements. Par contre, lors du dernier prélèvement une différence significative ( $p$ -valeur  $< 0.05$ ) est toutefois observable entre la culture en association et la culture de pois pure (Figure 43). La teneur en Lb des nodosités de la culture en association est significativement plus élevée.

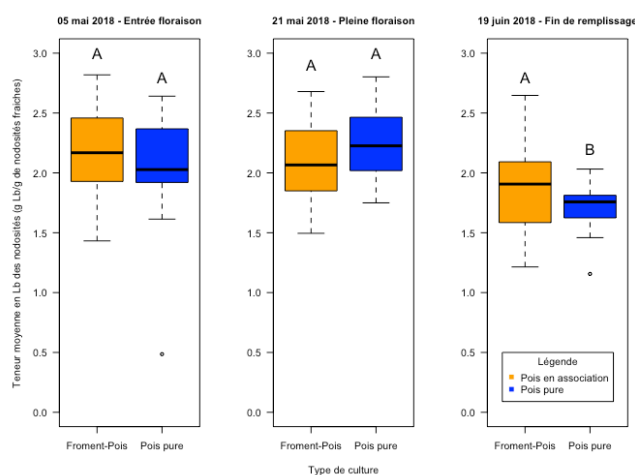


Figure 43: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités de deux types de cultures (pois en association avec du froment et en culture pure) au cours de leur floraison jusqu'à la fin de remplissage des graines.

#### 4.2.2 Teneur maximale en Lb des nodosités

Concernant la teneur moyenne maximale prédite en Lb des nodosités, aucune différence significative n'est mise en évidence pour les deux types de cultures aux différentes dates. Cependant, lors du remplissage des graines, la teneur maximale des nodosités diminue. Les nodosités semblent être entrées dans leur phase de sénescence ( $p$ -valeur < 0.001) (Tableau 5).

Tableau 5: Teneurs maximales prédites en Lb des nodosités pour les deux types de cultures (pois en association & pois pur) pour les différentes dates de prélèvements.

Teneur MAXIMALE moyenne en Lb d'une nodosité fraîche prédite ( $\text{mg g}^{-1}$ )							
Date							
02-05-18 Entrée en floraison		21-05-18 Pleine floraison		19-05-18 Fin de remplissage			
Type de culture	Moyenne	Std	Moyenne	Std	Moyenne	Std	
Pois association	3.132	A 0.54	3.289	A 0.48	2.803	B 0.54	
Pois pure	3.353	A 0.78	3.589	A 0.48	2.988	B 0.41	

#### 4.2.3 Teneur minimale en Lb des nodosités

Selon l'analyse de la variance, la teneur moyenne minimale prédite en Lb des nodosités présente des différences hautement significatives entre les deux types de cultures. Le Tableau 6 ci-dessous met ces différences en évidence avec l'appui des valeurs calculées du premier quantile (Q1) et du troisième quantile (Q3). Les teneurs minimales prédites en Lb des nodosités ont tendance à varier fortement au sein des prélèvements à une date donnée, mais elles restent néanmoins plus importantes pour les cultures en association.

Tableau 6: Teneurs minimales prédites en Lb des nodosités pour les deux types de cultures (pois en association & pois purs) pour les différentes dates de prélèvements.

Teneur MINIMALE moyenne en Lb des nodosités fraîches prédites ( $\text{mg g}^{-1}$ )											
Date											
02-05-18				21-05-18				19-06-18			
Type de culture	Q1	Moy	Q3	Q1	Moy	Q3	Q1	Moy	Q3		
Pois association	0.21	0.81	1.29	A 0.48	0.82	1.06	A 0.47	1.05	1.54	A	
Pois pure	0.11	0.51	0.68	B 0.28	0.66	0.95	B 0.21	0.37	0.45	B	

#### 4.2.4 Biomasse aérienne et évolution du nombre de nodosités au cours du temps.

Dans les parcelles de pois en association et de pois pur, le poids moyen de chaque plante de pois, issu des deux types de culture, ne se différencie pas significativement lors de chaque prélèvement ( $p$ -valeur = 0.17).

Le nombre de nodosités prédites par le modèle de régression PLS 2017 diminue pour les deux types de cultures significativement entre les dates de prélèvement ( $p$ -valeur < 0.05).

### 4.3 Discussion des résultats

Dans ce chapitre il a été mis en évidence que la teneur moyenne et maximale en Lb des nodosités des deux types de cultures est à son maximum lors de la floraison de la culture. Ces teneurs ne se différencient pas pour les deux types de cultures à cette période-là. Cependant, à l'approche de la fin du remplissage du grain de pois après la floraison, la plante de pois en association possède une teneur en Lb qui se différencie significativement de la culture de pois pure. De plus, les teneurs minimales en Lb des nodosités des pois en association sont aussi systématiquement plus importantes que celles obtenues dans la culture de pois pure.

Selon Naudin (2010), la compétition interspécifique qui existe entre la céréale et le pois dans une culture en association, force la légumineuse à couvrir ses besoins d'azote principalement par la fixation symbiotique. Dans l'expérience ci-présente, la teneur moyenne et maximale en Lb des nodosités ne semble pas se différencier significativement pour la culture de pois pure et en association lors de la floraison. Néanmoins, au stade « fin de remplissage des graines du pois », la teneur moyenne en Lb des nodosités est significativement plus importante que celles des pois en culture pure. Même si les nodosités des pois pour les deux types cultures sont déjà entrées dans leur phase de sénescence, il semblerait qu'elles restent actives plus longtemps dans le cas du pois en association. De plus, la culture de pois en association est aussi entrée en fleurs quelques jours plus tôt que la culture de pois pure et renforcerait donc ces propos. Deuxièmement, la teneur minimale des nodosités semble être plus importante pour les nodosités des pois en association tout au long de la floraison du pois jusqu'à la fin du remplissage des graines de pois.

Il est aussi à remarquer que le froment se trouve au stade BBCH 73 « stade laiteux » lors de la dernière date de prélèvement. A ce moment, les nodosités du pois sont déjà entrées en phase de sénescence car une diminution de la teneur en Lb est observée. De plus, une diminution des nodosités est observée entre les différentes dates. L'apparition de larves de sitones dans les nodosités dès la floraison ont détruit un nombre non négligeable de nodosités présentes essentiellement sur la racine principale de la plante de pois en association. Ces phénomènes peuvent laisser sous-entendre que des transferts d'azote entre les deux espèces de plantes pourraient être possible.

Il est effectivement difficile de pouvoir tirer une conclusion générale de ces résultats. Mais il semblerait que la culture en association aurait la capacité de pouvoir fixer l'azote sur une durée plus importante qu'une culture de pois pure. Il est à noter que l'année s'est aussi déroulée dans des conditions climatiques plus chaudes que la normale et que les précipitations en eau étaient très faibles dans la région de Gembloux. Le froment qui joue un rôle dans la compétition de l'azote en association, a sûrement eu un effet bénéfique sur un développement plus tardif de la culture de pois.

## 5 La fixation symbiotique de l'azote chez les différentes variétés de pois de printemps

### 5.1 Introduction

Dans la parcelle « Pois de printemps – Variété », la fixation symbiotique de l'azote a été suivie sur trois variétés de pois de printemps (Angelus, Safran et Tiberius) depuis leur entrée en floraison jusqu'à la fin de la floraison/remplissage des graines. Les teneurs en Lb des nodosités, séchées par ventilation, ont été prédites par le modèle de régression PLS 2017, qui a été décrit dans le chapitre 1 plus haut.

Il est à noter que les différentes parcelles de chaque variété ne se trouvaient pas dans un dispositif expérimental qui les répartissait aléatoirement. Les parcelles de chaque variété se trouvaient les unes à côtés des autres sans prendre en compte l'hétérogénéité du sol du dispositif expérimental (voir Figure 12 à la page 29). De plus, des sitones furent aussi observés dans ces parcelles.

### 5.2 Interprétation des résultats

#### 5.2.1 La teneur en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol

Les teneurs moyennes en Lb des nodosités ont été analysées dans des tranches d'horizons de 5 cm, qui descendent jusqu'à 15 cm dans le sol. Lors du premier prélèvement, les nodosités dans les différents horizons possédaient des teneurs en Lb qui étaient significativement différentes ( $p$ -valeur  $< 0.01$ ). L'horizon 1 (0 - 5 cm) contenait une teneur en Lb dans ses nodosités qui était la plus faible, alors que l'horizon 3 (10 - 15cm) possédait une teneur plus importante. Lors du deuxième prélèvement à la fin de la floraison, aucune différence significative n'était plus présente dans les différents horizons (Tableau 7).

Tableau 7: Teneurs moyennes en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol pour les trois variétés de pois de printemps. Deux mesures ont été réalisées: en début et en fin de floraison.

Horizon	Teneur moyenne en Lb des nodosités fraîches prédites ( $\text{mg g}^{-1}$ )					
	Date					
	31-05-18 : Début floraison		20-06-18 : Fin floraison			
	Moyenne		Std	Moyenne		Std
Horizon 1 : 0-5 cm	1.70	A	0.24	1.66	A	0.30
Horizon 2 : 5-10 cm	1.83	A,B	0.39	1.68	A	0.33
Horizon 3 : 10-15 cm	1.93	B	0.29	1.62	A	0.45

#### 5.2.2 Teneur moyenne en Lb des nodosités

Concernant la teneur moyenne en Lb des nodosités, celle-ci diminue au cours de la floraison pour les variétés de Safran et Tiberius. L'analyse de la variance met en évidence des différences hautement significatives ( $p$ -valeur  $< 0.01$ ) pour les deux prélèvements. Cependant

la teneur en Lb des nodosités a tendance à rester stable pour la variété Angelus, pour laquelle aucune différence significative n'a été mise en évidence entre l'entrée et la fin de la floraison.

Tableau 8: Teneurs moyennes en Lb des nodosités des trois variétés (Angelus, Safran et Tiberius) à leur entrée en floraison (30-05-2018) jusqu'à la fin de leur floraison (20-06-2018).

Teneur moyenne en Lb des nodosités fraîches prédites (mg g <sup>-1</sup> )						
Variétés						
Date	Angelus		Safran		Tiberius	
31-05-18	1.7191	A	2.018	A	1.7086	A
20-06-18	1.788	A	1.686	B	1.4586	B

Des différences entre les variétés pour les teneurs moyennes en Lb des nodosités ont été observées pour la première date de prélèvement en début de floraison. L'analyse de la variance indique que la variété Safran possède une teneur qui est très hautement significativement différente (p-valeur < 0.001) que les autres variétés Angelus et Tiberius en début de floraison (Figure 44). Cependant à la fin de la floraison plus aucune différence n'est observable entre les variétés Angelus et Safran. Tiberius possède toujours une teneur en Lb dans ses nodosités qui est significativement plus faible que les deux autres variétés (p-valeur < 0.01).

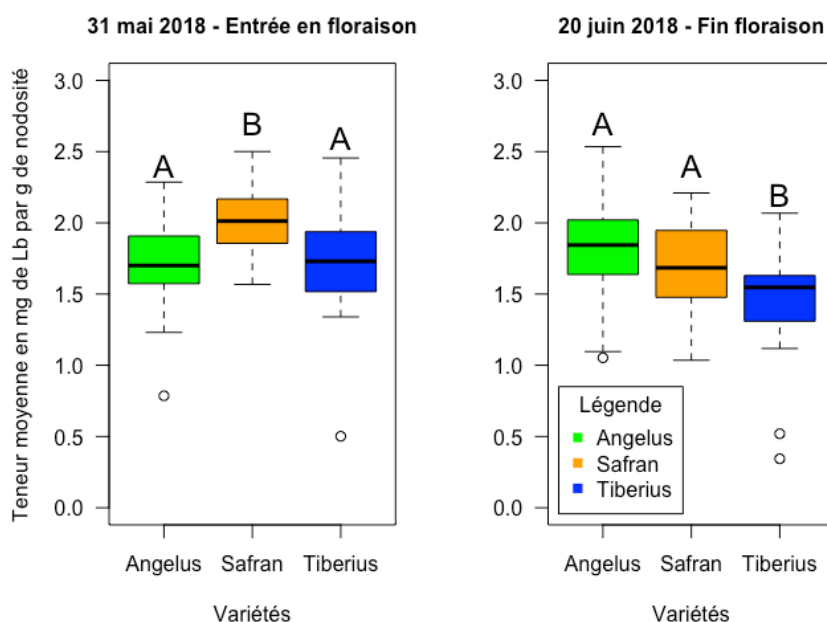


Figure 44: Evolution de la teneur moyenne en Lb des nodosités au cours de leur floraison pour les différentes variétés (Angelus, Safran, Tiberius).

### 5.2.3 Teneur maximale en Lb des nodosités

La teneur maximale en Lb des nodosités des différentes variétés montre des différences pour les trois variétés en début de floraison. La variété Safran possède une teneur maximale en Lb dans ses nodosités qui est significativement plus importante que les deux autres variétés Angelus et Tiberius (p-valeur < 0.01). A la fin de la floraison, l'analyse de la variance ne met



plus aucune différence en évidence pour la teneur maximale en Lb des nodosités issues des différentes variétés (p-valeur = 0.24). L'écart-type pour la dernière date a tendance à augmenter et indique donc une plus grande dispersion entre les teneurs maximales en Lb des nodosités en phase de sénescence.

Tableau 9: Teneurs maximales en Lb des nodosités de trois variétés (Angelus, Safran et Tiberius) à leur entrée en floraison (30-05-2018) jusqu'à la fin de leur floraison (20-06-2018).

Teneur MAXIMALE en Lb des nodosités fraîches prédites ( $\text{mg g}^{-1}$ )					
Date					
31-05-18			20-06-18		
Variétés	Moyenne	Std	Moyenne	Std	
Angelus	3.12	A	0.55	3.01	A
Safran	3.45	B	0.40	2.72	A
Tiberius	3.08	A	0.65	2.76	A

#### 5.2.4 Biomasse aérienne

La biomasse aérienne, exprimée en gramme par plante est illustrée à la Figure 45 ci-dessous pour les deux différentes dates de prélèvement.

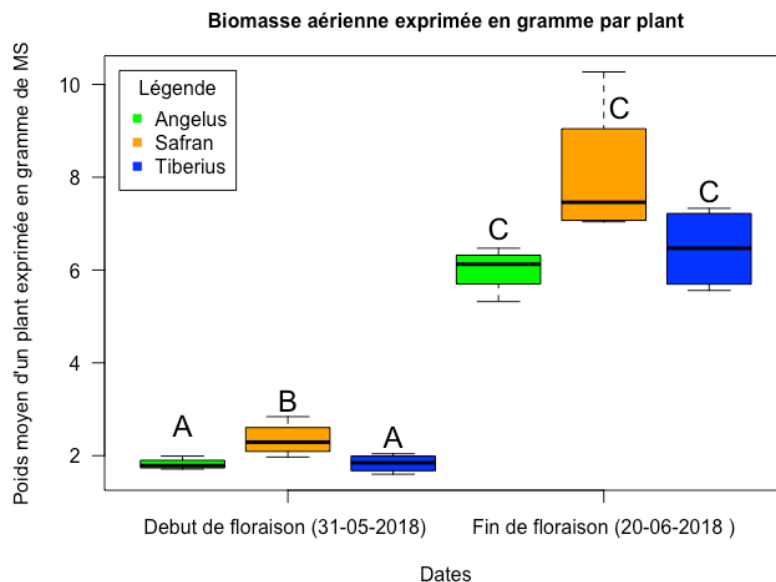


Figure 45: Poids moyen d'une plante de pois, exprimée en gramme de matière sèche. Les mesures ont été enregistrées en début et fin de la floraison pour les variétés Angelus, Safran et Tiberius.

Même si la biomasse par plant des variétés n'est pas significativement différente pour les deux prélèvements, la variété Safran semble toutefois sortir du lot. En début de floraison l'analyse de la variance met en évidence une différence significative pour le poids par plante de la variété Safran, exprimée en gramme de matière sèche (p-valeur < 0.05). À la fin de floraison aucune différence significative n'a par contre été mise en évidence (p-valeur = 0.052).

Lors du dernier prélèvement, les trois variétés ne possédaient pas un même nombre d'étages de gousses moyen à la fin de la floraison. La variété Safran était la plus garnie avec en moyenne 7 étages de gousses par plant. Elle était ensuite suivie par la variété Angelus qui possédait en moyenne 6 étages de gousses par plant. Enfin, 4 étages de gousses en moyenne furent retrouvés sur la variété Tiberius lors du dernier prélèvement.

### 5.3 Discussion des résultats

Globalement, dans ce chapitre, il a été mis en évidence que des différences significatives existent pour la fixation symbiotique de l'azote entre les variétés de pois de printemps pour les deux moments clés de la culture qui ont été analysés.

La variété Safran, qui est caractérisée par une floraison précoce, semble contenir une teneur moyenne et maximale en Lb plus importante dans ses nodosités que les variétés Tiberius et Angelus à l'approche de la floraison. Toutefois les variétés Angelus et Tiberius n'étaient pas encore en fleur lors du prélèvement, alors que la variété Safran avait déjà ses premières fleurs qui émergeaient. Selon Munier-Jolain *et al.*, 2005, l'augmentation de la vitesse de fixation des nodosités dépend de la disponibilité du carbone, issu de la photosynthèse, vers les racines pour le développement des nodosités. Par conséquent, le retard de croissance observé chez les variétés caractérisées par une floraison tardive expliquerait la plus faible teneur en Lb obtenue pour les nodosités des variétés Angelus et Tiberius, par rapport à la variété Safran, caractérisée par une floraison précoce. Cependant, à l'approche du stade où les derniers étages florifères émergeaient, pour les variétés Angelus et Safran, aucune différence ne pouvait être mise en évidence dans les teneurs en Lb des nodosités. Par contre, la variété Tiberius contenait une teneur en Lb dans ses nodosités qui est significativement plus faible. Il semblerait donc que les teneurs en Lb des nodosités des différentes variétés soient plutôt liées au stade d'avancement de la plante en début de culture.

Un autre point mis en évidence dans ce chapitre est une teneur en Lb des nodosités qui varie avec la profondeur du sol. Les nodosités présentes dans les horizons les moins profonds possèdent une teneur en Lb qui est plus faible que les horizons les plus profonds à l'approche de la floraison. Deux hypothèses expliqueraient ce phénomène. La première serait liée à la présence de sitones dans les premiers horizons. Ceux-ci ont un impact non négligeable sur le fonctionnement des nodosités. Deuxièmement, il a été démontré dans le chapitre 2 que des nodosités « secondaires » apparaissent plus tard sur le système végétatif de la plante et pourraient donc induire des différences dans la teneur moyenne en Lb des nodosités.

## 6 La fixation symbiotique de l'azote pour différentes fumures appliquées à une culture de pois de printemps

### 6.1 Introduction

Dans la dernière expérience, des applications de fumures en molybdène et en phosphore ont été appliquées dans la parcelle « Pois de printemps – Fumure » afin d'analyser la fixation symbiotique de l'azote dans les pois de printemps de la variété REBEL. Trois modalités de fumures ont été comparées à une modalité témoin pour laquelle aucune application n'a eu lieu.

Deux prélèvements ont été réalisés : un à la floraison le 30 mai 2018, une semaine après l'application des fumures, le second à la fin de la floraison le 21 juin 2018.

Les teneurs en Lb des nodosités ont été prédites avec le modèle de régression PLS 2017 qui a été discuté dans le premier chapitre.

### 6.2 Interprétation des résultats

#### 6.2.1 La teneur en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol

Tout comme dans le chapitre précédent, la teneur moyenne en Lb dans les différents horizons de sol a été analysée. Une même tendance est retrouvée. Le premier horizon possède une teneur en Lb qui est plus faible significativement que l'horizon 3, dix centimètres plus bas. De plus, cette tendance est retrouvée pour les deux dates de prélèvement en début de floraison et à la fin de floraison (Tableau 10).

Tableau 10: Teneurs moyennes en Lb des nodosités dans les différents horizons du sol pour la variété REBEL. Deux mesures ont été réalisées: en début et en fin de floraison.

Teneur moyenne en Lb des nodosités fraîches prédites ( $\text{mg g}^{-1}$ )						
Date						
30-05-18 : Début floraison						
21-06-18 : Fin floraison						
Horizon	Moyenne		Std	Moyenne		Std
Horizon 1 : 0-5 cm	1.83	A	0.27	1.72	A	0.27
Horizon 2 : 5-10 cm	1.96	A,B	0.28	1.77	A,B	0.30
Horizon 3 : 10-15 cm	2.05	B	0.36	1.90	B	0.37

### 6.2.2 Teneur moyenne en Lb des nodosités

Au sein des différentes modalités de fumures, aucune différence significative entre les modalités n'a pu être mise en évidence pour les teneurs en Lb des nodosités lors du premier prélèvement en début de floraison (p-valeur = 0.08). Cependant, même si aucune différence significative n'est observable, les modalités semblent contenir une teneur en Lb plus importante que le témoin lors du premier prélèvement en début de floraison, à l'exception de la modalité fumure associée (molybdène + phosphore) (Tableau 11).

A la fin de la floraison, la teneur en Lb des nodosités de la modalité témoin est significativement différente des modalités de fumure de phosphore et de la fumure associée (p-valeur < 0.05). Cependant, elle est statistiquement non différente de la fumure du molybdène.

Tableau 11: Représentation de la teneur en Lb moyenne des nodosités pour les différentes modalités de fumure et la modalité témoin pour les deux dates de prélèvements.

Teneur moyenne en Lb des nodosités fraîches prédites (mg g <sup>-1</sup> )						
Date						
30-05-18 : Début floraison			21-06-18 : Fin floraison			
Modalité de fumure	Moyenne		Std	Moyenne		Std
Application molybdène (210g/ha)	2.06	A	0.31	1.86	A,B	0.30
Application phosphore (50kg/ha)	1.95	A	0.28	1.69	A	0.26
Application molybdène + phosphore	1.95	A	0.32	1.73	A	0.38
Témoin	1.84	A	0.32	1.95	B	0.29

### 6.2.3 Teneur maximale en Lb des nodosités

Résultats similaires pour les teneurs maximales en Lb des nodosités prédites, celles-ci ne sont pas significativement différentes pour la première date de prélèvement entre les différentes modalités de fumures et leur témoin. Cependant, les nodosités pour lesquelles une application de molybdène ou de phosphore a eu lieu, possèdent une teneur en Lb qui est plus importante que celle du témoin.

Lors du deuxième prélèvement en fin de floraison, les teneurs en Lb des nodosités des modalités de fumure « phosphore » et « molybdène » ne se différencient pas significativement de la teneur en Lb des nodosités de la modalité témoin. Cependant une différence significative existe entre la modalité témoin et la modalité des fumures molybdène et phosphore.

Tableau 12: Représentation de la teneur en Lb moyenne des nodosités pour les différentes modalités de fumure et la modalité témoin pour les deux dates de prélèvements.

Modalité de fumure	Teneur maximale en Lb des nodosités fraîches prédites ( $\text{mg g}^{-1}$ )				
	Date				
	30-05-18 : Début floraison		21-06-18 : Fin floraison		
	Moyenne	Std	Moyenne	Std	
Application molybdène (210g/ha)	3.51	A	0.31	3.15	A,B
Application phosphore (50kg/ha)	3.45	A	0.28	3.07	A,B
Application molybdène + phosphore	3.36	A	0.32	2.76	A
Témoin	3.32	A	0.32	3.30	B

#### 6.2.4 Biomasse aérienne et mesure du pH

Aucune différence significative n'est mise en évidence par l'analyse de la variance pour la biomasse aérienne de chaque plant moyen entre les différentes modalités de fumures (p-valeur = 0.95).

Une mesure qualitative du pH du sol a été mesurée sur la parcelle en fin d'expérience. Elle caractérise le sol comme étant neutre. Une illustration de deux des cinq mesures réalisées est représentée à la Figure 46.



Figure 46: Illustration de deux mesures de pH qui ont été réalisées sur la parcelle "Pois de printemps - fumure" en fin d'expérience.

### 6.3 Discussion des résultats

Sur base des observations de ce chapitre, aucune différence significative entre les teneurs en Lb des nodosités n'a été observée pour les différentes modalités de fumures et la modalité témoin.

Les conditions climatiques et leurs faibles précipitations durant la culture n'ont pas permis au phosphore de migrer dans le sol comme espéré. De plus, le pH neutre du sol n'a pas ou très peu permis de solubiliser le phosphore naturel qui a été appliqué sur la parcelle. Les chances sont donc minimales qu'il ait pu être assimilé par la plante et interagir au niveau de la fixation symbiotique de l'azote. De plus, aucune différence significative au niveau de la teneur en Lb des nodosités n'est remarquée. Cet amendement aurait dû être appliqué en incorporation lors de la préparation du sol en pour permettre une assimilation par la plante.

Le molybdène, dont la teneur normale du sol se situe entre 0.5 et 5 ppm, se répartit en plusieurs pools dans le sol. Il est soit déjà présent dans la solution du sol, soit adsorbé sur les différentes composantes du sol. Cependant, quand le pH du sol augmente, son adsorption diminue et est même absente à un pH de 8 (Destain, 2015). Un pH entre 6 et 7, comme il a été mesuré qualitativement sur la parcelle, ne mettait donc initialement aucune carence de molybdène en évidence. L'application foliaire de molybdène au niveau de leur feuillage une semaine avant leur floraison, n'a pas permis de mettre en évidence une teneur en Lb des nodosités plus élevée pour ces modalités de fumures. Il est à noter qu'une tendance positive est observée tout de même pour les 2 fumures de molybdène (seules et en association) à la première date de prélèvement. Une mesure de la concentration de la teneur en molybdène au niveau de la plante ou au niveau des nodosités permettrait de mettre en évidence une assimilation variable entre les modalités au niveau de la plante.

## V. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'activité fixatrice de l'azote au sein des nodosités de pois protéagineux par imagerie hyperspectrale. Deux axes de conduite ont été établis afin de répondre à ces attentes. Le premier vise à établir les conditions qui permettent de mesurer par imagerie hyperspectrale la teneur en leghémoglobine, une molécule indicatrice de la fixation symbiotique de l'azote, au sein de ces nodosités. Le second axe permet d'évaluer l'activité fixatrice de l'azote dans les nodosités de la culture de pois protéagineux (*Pisum sativum* L.) qui a été conduite selon plusieurs mode de cultures.

Concernant le premier axe, il a été mis en évidence que le séchage des nodosités est une étape cruciale dans la préparation des échantillons avant d'acquérir leurs images hyperspectrales. Le type de séchage induit des propriétés physico-chimiques différentes au sein des nodosités qui ne permettent pas de prédire la teneur en Lb dans les nodosités de manière identique. C'est pourquoi il serait intéressant de regarder dans quelle mesure le type de séchage soit le plus approprié afin de quantifier la leghémoglobine le plus précisément possible dans les nodosités.

Néanmoins, les deux types de séchage, qui ont été étudiés, permettent tout de même de quantifier la teneur en Lb des nodosités par l'imagerie hyperspectrale, pour autant que le modèle de prédiction soit bien calibré au préalable. Car en effet, il est tout aussi essentiel de calibrer le modèle de prédiction pour une gamme dans laquelle les teneurs peuvent être prédites. Pour le modèle de régression PLS 2018 qui a été discuté dans ce travail, il s'avère qu'il soit adapté à prédire les teneurs en Lb des nodosités, séchées par convection à 60°C pendant 24 heures, allant de 3 et 7 mg de Lb par gramme de nodosités fraîches.

La valeur obtenue de 0,72 pour le coefficient de détermination ( $R^2$ ) à l'issue de la calibration du modèle de régression PLS 2018 permet de prédire les teneurs en Lb de nodosités de façon approximatives selon Saeys, Mouazen et Ramon (2005). Ceci permet donc d'avoir une bonne approche sur l'activité fixatrice de l'azote chez les nodosités du pois protéagineux.

Sur base d'un modèle de régression PLS préalablement calibré pour prédire la teneur en Lb des nodosités, l'imagerie hyperspectrale offre la possibilité de quantifier rapidement et de manière non-destructive la teneur en Lb au sein des nodosités dans l'espace et dans le temps. Il a été mis en évidence que la teneur en leghémoglobine diffère au sein de ses nodosités en fonction de sa position sur le système racinaire et de sa taille. De plus, l'imagerie hyperspectrale permet aussi de caractériser l'activité fixatrice de l'azote, à un moment donné, dans les nodosités indéterminées du pois protéagineux dont la teneur en Lb évolue au cours du temps.

Dans le deuxième axe, l'activité fixatrice de l'azote a été évaluée dans les nodosités issues de différentes cultures de pois (en culture pure d'hiver, de printemps et en association) sur base

de la teneur en Lb des nodosités prédite par l'imagerie hyperspectrale. Cette teneur est exprimée en milligramme de Lb par gramme de nodosités fraîches.

De manière générale, outre les conditions exceptionnelles qui ont été rencontrées durant cette expérience dans la culture de pois protéagineux, il semblerait que la teneur en leghémoglobine prédite au sein des nodosités soit liée en début de culture au stade d'avancement de la plante de pois. Des différences significatives entre les variétés sont rencontrées en début de culture mais semblent disparaître à l'approche de la floraison. Cependant, le nombre de nodosités rencontrées sur les racines principales se diffère significativement entre variétés. Ceci mène donc à conclure que certaines variétés sont sujettes à fixer plus d'azote atmosphérique à l'échelle de leurs nodosités sur la racine principale, pour autant que leur masse soit identique.

Pour les différents stades clés de la culture en association entre le froment et le pois qui ont été analysés, la teneur en Lb des nodosités ne semble pas se différencier significativement au sein de la floraison. Par contre, comparé à une culture pure, les nodosités issues de l'association auraient l'aptitude en fin de culture à rester plus longtemps actives et ce jusqu'au stade remplissage du grain de froment.

Les applications de phosphore et de molybdène n'ont pas permis de mettre en évidence une activité fixatrice de l'azote plus importante comparée à une plante témoin. Les conditions climatiques n'ont pas permis au phosphore de se solubiliser au niveau du sol. Concernant l'application foliaire de molybdène, une teneur en Lb plus importante au niveau des nodosités n'a pas été mise en évidence.

Enfin, l'imagerie hyperspectrale permet d'offrir plusieurs possibilités d'avenir dans l'analyse de l'activité fixatrice de l'azote au sein des légumineuses. La capacité à prédire la teneur en leghémoglobine au sein des nodosités est déjà un pas en avant. Cependant, les différentes tailles de nodosités amènent à penser que plus les nodosités sont de grande taille, plus elles ont la capacité à y fixer de l'azote en début de culture et à l'approche de la floraison. Au contraire en début de phase de sénescence ces nodosités ont moins l'aptitude à fixer de l'azote que les petites nodosités qui ont émergé plus tardivement. Une approche plus approfondie permettrait de distinguer les nodosités actives et moins actives en fin de culture. Une autre approche qui pourrait être réalisée en même temps serait l'identification de la présence des sitones, un insecte ravageur qui pondent leurs œufs dans les nodosités et les détruit par après.

Pour finir au sein de ce TFE, l'analyse de la teneur en Lb des nodosités a été mesurée sur le système racinaire complet de la plante et sur des nodosités isolées. Les limites de l'imagerie hyperspectrales induisent parfois des biais dans l'identification des prédictions. Une analyse sur des nodosités isolées serait la plus appropriée pour obtenir une mesure plus précise.



## VI. Bibliographie

- Abras, M. *et al.* (2016) 'Le pois protéagineux: Une légumineuse à graines riches en protéines et en énergie'.
- Appleby, C. A. (1984) 'Leghemoglobin and Rhizobium respiration'.
- ARVALIS (2018) *Le sitone*. Available at: [http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche\\_accident/fiches\\_accidents.php?mode=fa&type\\_cul=9&type\\_acc=3&id\\_acc=318](http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche_accident/fiches_accidents.php?mode=fa&type_cul=9&type_acc=3&id_acc=318)
- Becana, M. and Moran, J. F. (1994) 'Structure and function of leghemoglobins', *An. Estac. Exp. Aula Dei*, 21(3), pp. 203–208.
- Bousseau, D. (2009) 'Innovations Agronomiques (2009) 7, 129-137', *Innovations Agronomiques*, 7, pp. 129–137.
- Brkić, S. *et al.* (2004) 'Pea yield and its quality depending on inoculation, nitrogen and molybdenum fertilization', *Plant, Soil and Environment*, 50(1), pp. 39–45.
- Carrouée, B., Crépon, K. and Peyronnet, C. (2003) 'Les protéagineux : intérêt dans les systèmes de production fourragers français et européens', *Fourrages*, 174, pp. 163–182.
- Coudurier, B. *et al.* (2013) 'Vers des agricultures à hautes performances', *Inra*, 4, pp. 12–164.
- Couëdel, A. (2015) *Analyse de l'effet variétal du pois protéagineux sur les performances agronomiques dans les associations blé dur- pois d' hiver ( Triticum turgidum L. – Pisum sativum L.)*.
- Cuvelier, C. and Dufrasne, I. (2015) 'L'alimentation de la vache laitière : Aliments, calculs de ration, indicateurs d' évaluation des déséquilibres de la ration et pathologies d' origine nutritionnelle', *Livret de l'agriculture*, pp. 1–105.
- Dakora, F. D. (1995) 'A Functional-Relationship between Leghaemoglobin and Nitrogenase Based on Novel Measurements of the 2 Proteins in Legume Root-Nodules', *Annals of Botany*, 75(1), pp. 49–54.
- Dale, L. *et al.* (2012) 'Chemometric Tools for NIRS and NIR Hyperspectral Imaging', XVII(1), pp. 69–77.
- Dale, L. M. *et al.* (2013) 'Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: A review', *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(2), pp. 142–159.
- Destain, J.-P. (2015) *Matières fertilisantes*.
- Divito, G. A. and Sadras, V. O. (2014) 'How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis', *Field Crops Research*. Elsevier B.V., 156, pp. 161–171.
- Dupont, L. *et al.* (2012) 'The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence'.
- Erman, M. *et al.* (2009) 'Effect of phosphorus application and rhizobium inoculation on yield and nutrient uptake of pisum sativum', *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), pp. 301–304.

- Eylenbosch, D. *et al.* (2018a) 'Quantification of leghaemoglobin content in pea nodules based on near infrared hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics Quantification of Leghaemoglobin Content in Pea Nodules', *J. Spectral Imaging*, 7, pp. 1–10.
- Eylenbosch, D. *et al.* (2018b) 'Utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée aux outils de la chimiométrie dans l'étude de systèmes racinaires.', *Phloèmes - Actes du congrès*, (1), pp. 226–236.
- Fernández Pierna, J. A. *et al.* (2012) 'NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier B.V., 117, pp. 233–239.
- Hirsch, A. M. (1992) 'Developmental biology of legume nodulation', *New Phytol.*, 122(40), pp. 211–237.
- Hopkins, W. G., Rambour, S. and Evrard, C. M. (2003) *Physiologie végétale*. De Boeck. ed.
- Israel, D. W. (1987) 'Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation.', *Plant physiology*, 84(3), pp. 835–40.
- Iver, J. (1985) 'The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*)', *Physiologia Plantarum*, 64(2), pp. 190–196.
- Johnson, H. S. and Hume, D. J. (1973) 'Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction', *Canadian Journal of Microbiology*, 19(9), pp. 1165–1168.
- Justes, E., Bedoussac, L. and Prieur, L. (2009) 'Est-il possible d'améliorer le rendement et la teneur en protéines du blé en Agriculture Biologique au moyen de cultures intermédiaires ou de cultures associées ?', *Innovations Agronomiques*, 4, pp. 165–176.
- Kaiser, B. N. *et al.* (2005) 'The role of molybdenum in agricultural plant production', *Annals of Botany*, 96(5), pp. 745–754.
- Kusumo, B. H. *et al.* (2011) 'Measuring carbon dynamics in field soils using soil spectral reflectance: Prediction of maize root density, soil organic carbon and nitrogen content', *Plant and Soil*, 338(1), pp. 233–245.
- Lecoeur J. & Turc O., 1994. Initiation et chronologie d'apparition des organes sur une tige de pois. *Agrophysiologie du pois protéagineux*, UNIP – ITCF – INRA, mai 1994, pp. 13-20.
- Légère, R. (2011) 'Pois protéagineux de printemps et d'hiver - Guide de culture 2011-2012'.
- Lithourgidis, A. S. *et al.* (2011) 'Dry matter yield, nitrogen content, and competition in pea-cereal intercropping systems', *European Journal of Agronomy*. Elsevier B.V., 34(4), pp. 287–294.
- Majdi, H. (1996) 'Root sampling methods - applications and limitations of the minirhizotron technique Hooshang Majdi', *Plant and Soil*, 185, pp. 255–258.
- Malézieux, E. *et al.* (2009) 'Review article Mixing plant species in cropping systems : concepts , tools and models . A review', *Agronomy for Sustainable Development*, 29, pp. 43–62.
- Martins, D. *et al.* (2017) *The Influence of Phosphate Deficiency on Legume Symbiotic N2 Fixation, Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability: Adaptation and Regulatory Implication*.
- De Mendiburu, F. (2017) 'Package "agricolae "'.

- Milev, G. (2014) 'Effect of Foliar Fertilization on Nodulation and Grain Yield of Pea (*Pisum sativum* L.)', pp. 668–672.
- Mouillet, Y. (2000) 'Désintensification et autonomie en protéines', *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 24, pp. 125–128.
- Munier-Jolain, N. *et al.* (2005) *Agrophysiologie du pois protéagineux*. Edited by INRA. Quae.
- Munier-Jolain, N. and Carrouée, B. (2003) 'Quelle place pour le pois dans une agriculture respectueuse de l'environnement? Argumentaire agri-environnemental', *Cahiers Agricultures*, 12(2), pp. 111–120.
- Naudin, C. (2010) *Nutrition azotée des associations Pois-Blé hiver ( Pisum sativum L. – Triticum aestivum L. ) : Analyse, modélisation et propositions de stratégies de gestion*.
- Naudin, C. *et al.* (2011) 'Inhibition and recovery of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by peas (*Pisum sativum* L.) in response to short-term nitrate exposure', *Plant and Soil*, 346(1), pp. 275–287.
- Naumann, A., Heine, G. and Rauber, R. (2010) 'Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra', *Field Crops Research*.
- Pierreux, J. *et al.* (2014) 'Perspectives offertes par la culture en association de froment et de pois protéagineux d' hiver', *Livre Blanc 'Céréales'*, (1), pp. 25–32.
- Proctecteau (2016) 'CIPAN : quelles obligations respecter ?', pp. 1–3.
- PROLEA : La filière française des Huiles et Protéines Végétales* (2009). Available at: <http://chimierenouvelable.org/index.php?id=1582> (Accessed: 7 July 2018).
- Rabbani, M. G. *et al.* (2005) 'Effects of Rhizobium Inoculant, Nitrogen, Phosphorus, and Molybdenum on Nodulation, Yield, and Seed Protein in Pea', *Korean J Crop Sci*, 50(2), pp. 112–119.
- Robson, A., O'hara, G. and Abbott, L. (1981) 'Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.)', *Functional Plant Biology*, 8(5), pp. 427–436.
- Roggo, Y., Gendrin, C. and Spiegel, C. (2007) 'Intérêt de l'imagerie chimique proche infrarouge pour l'industrie pharmaceutique', *Spectra Analyse*, 258.
- Saeys, W., Mouazen, A. M. and Ramon, H. (2005) 'Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy', *Biosystems Engineering*, 91(4), pp. 393–402.
- Sanz-Saez, A. *et al.* (2017) 'P Deficiency: A Major Limiting Factor for Rhizobial Symbiosis', in *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability: Adaptation and Regulatory Implication*, pp. 21–39.
- Šarūnaitė, L., Deveikytė, I. and Kadžiulienė, Ž. (2010) 'Intercropping spring wheat with grain legume for increased production in an organic crop rotation', *Žemdirbystė=Agriculture*, 97(3), pp. 51–58.
- Scherer, H. W. *et al.* (2008) 'Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N<sub>2</sub> fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions', *Biol Fert Soils*, 44(7), pp. 909–916.
- Schneider, A. *et al.* (2015) 'Rôle des légumineuses dans l'agriculture française', in Quae (ed.) *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables*, pp. 11–77.

- Sigma-Aldrich (2015) *Drabkin's Reagent Catalog*.
- Sillon Belge (2018) *Cosucra finalise un investissement de 35 millions d'euros*. Available at: <http://www.sillonbelge.be/2612/article/2018-06-06/cosucra-finalise-un-investissement-de-35-millions-deuros> (Accessed: 7 July 2018).
- Silisbury, J. H. (1990) 'Growth, nitrogen accumulation and partitioning, and N<sub>2</sub> fixation in faba bean (*Vicia faba* cv. Fiord) and pea (*Pisum sativum* cv. Early Dun)', 24, pp. 173–188.
- Snee, R. (1977) 'Validation of Regression Models: Methods and Examples', *TECHNOMETRIC*, 19(October).
- Taiz, L. *et al.* (2014) *Plant Physiology and Development*. 6th edn. Sinauer.
- Tricot Pellerin F., Angevin F., Crozat Y.. 1994. In : Ney B., Duchêne E., Carrouée B., Angevin F.(eds.). *Agrophysiologie du pois protéagineux : applications à la production agricole*. Paris : INRA, p. 75-91.
- Tricot, F., Crozat, Y. and Pellerin, S. (1997) 'Root system growth and nodule establishment on pea (*Pisum sativum* L.)', *Journal of Experimental Botany*, 48(316), pp. 1935–1941.
- Vermeulen, P. *et al.* (2012) 'Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using near infrared hyperspectral imaging', *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(2), pp. 232–240.
- Voisin, A.-S., Cellier, P. and Jeuffoy, M.-H. (2015) 'Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N<sub>2</sub> des légumineuses à graines : Impacts Agronomiques et Environnementaux', *Innovations Agronomiques*, 43, pp. 139–160.
- Voisin, A.-S. and Gastal, F. (2015) 'Nutrition azotée et fonctionnement agrophysiologique spécifique des légumineuses', in Quae (ed.) *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables*, pp. 79–137.
- Voisin, A. *et al.* (2013) 'Les légumineuses dans l'Europe du XXI<sup>e</sup> siècle : Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche?', *Innovations Agronomiques, Inra*, 30, pp. 283–312.
- Williams, P. J. (2009) *Near Infrared (NIR) Hyperspectral Imaging For Evaluation of Whole Maize Kernels: Chemometrics for Exploration and Classification*.
- Wilson, D. O. and Reisenauer, H. M. (1963) 'Determination of leghemoglobin in legume nodules', *Analytical Biochemistry*, 6, pp. 27–30.
- Zimmer, W. and Mendel, R. (1999) 'Molybdenum metabolism in plants', *Plant Biology*, 1(2), pp. 160–168.

## VII. Annexes

### 1. Tableau récapitulatif des itinéraires phytotechniques de chaque parcelle

#### a. Parcelle Pois d'hiver

Itinéraire technique parcelle « pois d'hiver »		
Date	Opérations réalisées	Détails
16/11/17	Semis	Parcelle pois hiver 2018
17/11/17	Désherbage	Stomp aqua 2l/ha
5/12/18	Désherbage	Challenge 4l/ha
25/05/18	Fongicide	Bravo 2l/ha

#### b. Parcelle Pois en association

Itinéraire technique parcelle « pois en association »		
Date	Opérations réalisées	Détails
15/11/17	Semis	Parcelle pois en association avec du froment 2018
17/11/17	Désherbage	Stomp aqua 2l/ha
5/12/18	Désherbage	Challenge 4l/ha
16/04/18	Fumure	Fumure tallage-redressement
22/05/2018	Fumure	Fumure dernière feuille
25/05/18	Fongicide	Bravo 2l/ha
6/06/2018	Fongicide	Caramba 1,2 l/ha

#### c. Parcelle Pois de printemps – variété

Itinéraire technique parcelle « pois de printemps – variété »		
Date	Opérations réalisées	Détails
10/04/2018	Semis	Parcelle pois de printemps variété
12/04/2018	Désherbage	Stomp aqua 1,8l/ha + Challenge 1l/ha
7/06/2018	Fongicide	1 l/ha Amistar
7/06/2018	Insecticide	1 l/ha Primor

#### d. Parcelle Pois de printemps – fumure

Itinéraire technique parcelle « pois de printemps – fumure »		
Date	Opérations réalisées	Détails
10/04/2018	Semis	Parcelle pois de printemps fumure
12/04/2018	Désherbage	Stomp aqua 1,8l/ha + Challenge 1l/ha
22/05/2018	Fumure	Application de PHYSALG25 et de CHELAL Mo
7/06/2018	Fongicide	1 l/ha Amistar
7/06/2018	Insecticide	1 l/ha Primor

#### 2. Somme des degrés-jours pour la culture de pois d'hiver (base 0°C)

*(Représentation à la page suivante)*

Date	Somme °C/jour														
15-nov	7	12-déc	116	7-janv	262	3-févr	392	2-mars	415	29-mars	557	25-avr	891	22-mai	1244
16-nov	15	13-déc	120	8-janv	265	4-févr	392	3-mars	416	30-mars	565	26-avr	900	23-mai	1261
17-nov	21	14-déc	123	9-janv	272	5-févr	392	4-mars	421	31-mars	571	27-avr	912	24-mai	1278
18-nov	24	15-déc	126	10-janv	277	6-févr	392	5-mars	427	1-avr	577	28-avr	925	25-mai	1297
19-nov	28	16-déc	128	11-janv	282	7-févr	392	6-mars	432	2-avr	586	29-avr	934	26-mai	1319
20-nov	33	17-déc	129	12-janv	285	8-févr	392	7-mars	436	3-avr	597	30-avr	943	27-mai	1340
21-nov	42	18-déc	134	13-janv	287	9-févr	392	8-mars	441	4-avr	607	1-mai	950	28-mai	1361
22-nov	52	19-déc	138	14-janv	293	10-févr	393	9-mars	446	5-avr	614	2-mai	961	29-mai	1381
23-nov	63	20-déc	144	15-janv	298	11-févr	396	10-mars	457	6-avr	623	3-mai	972	30-mai	1401
24-nov	71	21-déc	152	16-janv	301	12-févr	398	11-mars	469	7-avr	638	4-mai	984	31-mai	1422
25-nov	74	22-déc	161	17-janv	307	13-févr	399	12-mars	478	8-avr	654	5-mai	998	1-juin	1439
26-nov	76	23-déc	169	18-janv	310	14-févr	400	13-mars	484	9-avr	667	6-mai	1015	2-juin	1455
27-nov	81	24-déc	177	19-janv	312	15-févr	405	14-mars	491	10-avr	681	7-mai	1031	3-juin	1473
28-nov	86	25-déc	182	20-janv	314	16-févr	408	15-mars	498	11-avr	691	8-mai	1049	4-juin	1492
29-nov	88	26-déc	187	21-janv	321	17-févr	410	16-mars	506	12-avr	700	9-mai	1066	5-juin	1509
30-nov	89	27-déc	192	22-janv	329	18-févr	412	17-mars	506	13-avr	711	10-mai	1079	6-juin	1528
1-déc	89	28-déc	193	23-janv	340	19-févr	413	18-mars	506	14-avr	723	11-mai	1093	7-juin	1548
2-déc	89	29-déc	195	24-janv	347	20-févr	414	19-mars	506	15-avr	736	12-mai	1110	8-juin	1567
3-déc	89	30-déc	204	25-janv	352	21-févr	415	20-mars	507	16-avr	748	13-mai	1121	9-juin	1585
4-déc	93	31-déc	215	26-janv	357	22-févr	415	21-mars	509	17-avr	762	14-mai	1135	10-juin	1605
5-déc	98	1-janv	221	27-janv	364	23-févr	415	22-mars	513	18-avr	778	15-mai	1150	11-juin	1622
6-déc	103	2-janv	227	28-janv	373	24-févr	415	23-mars	518	19-avr	798	16-mai	1166	12-juin	1637
7-déc	108	3-janv	235	29-janv	373	25-févr	415	24-mars	525	20-avr	817	17-mai	1178	13-juin	1651
8-déc	110	4-janv	244	30-janv	378	26-févr	415	25-mars	531	21-avr	834	18-mai	1188	14-juin	1665
9-déc	110	5-janv	251	31-janv	385	27-févr	415	26-mars	538	22-avr	852	19-mai	1198	15-juin	1682
10-déc	112	6-janv	256	1-févr	387	28-févr	415	27-mars	544	23-avr	866	20-mai	1211	16-juin	1698
11-déc	115	7-janv	259	2-févr	390	1-mars	415	28-mars	550	24-avr	878	21-mai	1228	17-juin	1713

**3. Illustration des images scannées au différents moments clés de la culture de pois**

**a. Le 16 février 2018, stade « 4 feuilles »**



**b. Le 12 mars 2018, stade « 6 feuilles »**



**c. Le 5 mai 2018, « début de floraison »**

