

# Utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée aux outils de la chimiométrie dans l'étude de systèmes racinaires.

*Damien Eylenbosch(1), Juan Antonio Fernández Pierna (2), Vincent Baeten (2), Bernard Bodson (1)*

*(1) Phytotechnie tempérée, AgroBioChem, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique.*

*(2) Qualité des produits, Départements Valorisation des productions, Centre de Recherche Agronomique wallon, Belgique.*

*d.eylenbosch@ulg.ac.be*

*Avec la collaboration de Benjamin Dumont, Marie-Pierre Hiel, Guillaume Fraipont et Jérôme Pierreux.*

## **Utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge combinée aux outils de la chimiométrie dans l'étude de systèmes racinaires.**

Lors d'études de systèmes racinaires sur base de prélèvements de carottes de sol, une étape préliminaire à la quantification racinaire consiste à éliminer manuellement les résidus de cultures et les particules de sol récupérés avec les racines lors du lavage des échantillons. En présence de racines de différentes espèces, cette étape s'accompagne d'un tri des racines selon différents critères. Pour faciliter et réduire le temps nécessaire à cette étape fastidieuse, la discrimination de ces éléments a été réalisée sur base d'images hyperspectrales prises en proche infrarouge. Les échantillons lavés et séchés ont été passés sous une caméra qui enregistre, pour chaque pixel de l'image, un spectre en proche infrarouge. Ces spectres sont liés à la nature physico-chimique des éléments présents sur l'image et ont été analysés à l'aide d'algorithmes d'analyses discriminantes qui permettent de les classer et de donner la nature de chaque pixel de l'image. Sur base du nombre de pixels classés comme étant des racines et grâce à la relation linéaire reliant ce nombre de pixels à la masse de racines présente dans l'échantillon, il fut finalement possible quantifier des racines au sein d'échantillons de sol sans devoir réaliser un tri manuel préalable et les peser.

Cette méthode a été testée avec succès en froment et a permis de mettre très clairement en évidence l'effet du travail du sol sur le développement du système racinaire. Elle est également été testée sur une culture associée de froment et de pois afin de quantifier séparément les racines des 2 espèces.

## **Use of near infrared hyperspectral imaging and chemometrics to study root systems.**

In studies on root systems using the soil coring method, roots, crop residues and soil particles extracted after washing of soil samples need to be manually sorted before root quantification. If different species are present in the sample, their discrimination is based on several criteria. In order to reduce the complexity and the time needed for this tedious sorting step, near infrared hyperspectral imaging was used to discriminate all these elements. Images of washed and dried samples were acquired with a camera saving, for each pixel, a near infrared spectrum. These spectra are linked to the physicochemical nature of the elements visible on the hyperspectral images and were analyzed with discriminant algorithms allowing their discrimination and to link each pixel spectrum to the nature of the elements. According to the number of pixels classified as roots and thanks to the linear relationship between the number of pixels and the root biomass in the sample, it was possible to quantify roots in soil samples without manual sorting and weighing.

This methodology was successfully tested on winter wheat roots and highlighted the tillage effect on root system development. It was also tested on wheat-pea intercropping in order to quantify separately the roots of each species.

## INTRODUCTION

La compréhension des interactions entre le système racinaire des cultures et l'environnement dans lequel elles se développent est nécessaire afin d'identifier les pratiques de gestion du sol appropriées et augmenter les performances des cultures. La manière dont les racines se développent dans l'espace et le temps détermine le potentiel de la culture à absorber l'eau et les nutriments et, finalement, le rendement de la culture (Plaza-Bonilla et al., 2014; Huang et al., 2012; Qin et al., 2004; Cheng et al., 1990). Le développement du système racinaire dépend fortement de la saison culturale, de la teneur en eau et de la structure du sol ainsi que du stade de développement de la plante (Cai et al., 2014; Plaza-Bonilla et al., 2014; Morell et al., 2011). Le temps nécessaire aux racines pour coloniser le sol en profondeur et la production de biomasse au niveau du système racinaire tout au long du cycle de développement de la plante sont dès lors de bons indicateurs pour interpréter le comportement de la plante cultivée selon différents modes de gestion et dans un contexte de sol et de climat donné. Certains paramètres influençant le développement racinaire peuvent en effet être modifiés par les pratiques culturales. C'est entre autre le cas avec le travail du sol qui influence la densité du sol et sa teneur en eau (Strudley et al., 2008). C'est également le cas pour les éléments nutritifs disponibles pour la plante dont les quantités présentes dans le sol peuvent être modifiées par la fertilisation ou encore lors d'une culture en association avec une légumineuse. Cette deuxième pratique fait l'objet de nombreuses recherches afin de réduire la dépendance des cultures céréalières à l'azote de synthèse et donc aux ressources d'énergies fossiles.

Cependant, la mesure des effets de ces pratiques culturales sur le développement racinaire des cultures se fait rarement dans des essais en champs car la présence du sol limite les observations et l'extraction des racines demande dès lors beaucoup de travail et de temps (Plaza-Bonilla et al., 2014). Leurs effets sur le développement racinaire restent donc mal connus.

Parmi les quelques méthodes utilisables pour étudier les systèmes racinaires en conditions de plein champ, celle basée sur le prélèvement de carottes de sol est fréquemment utilisée. Cette méthode est peu coûteuse, perturbe peu la culture et permet de nombreux prélèvements mais implique un lavage des carottes de sol et un tri des différents éléments présents au sein de l'échantillon de sol : racines, résidus de matières organiques, cailloux... Ce n'est qu'après ces étapes que les racines peuvent être analysées ou quantifiées (Plaza-Bonilla et al., 2014; Huang et al., 2012; Picon-Cochard et al., 2009; Izumi et al., 2004; Qin et al., 2004; Cheng et al., 1990). L'étape de tri est jusqu'à présent réalisée à la main ce qui la rend chronophage, pénible et sujette à l'habileté et la subjectivité de l'opérateur (Plaza-Bonilla et al., 2014). Selon Majdi (1996), cette étape constitue la limitation la plus importante de la méthode basée sur le prélèvement de carottes de sol car elle réduit la fréquence des échantillonnages réalisables durant la croissance de la culture. Dans le cas d'études s'intéressant aux systèmes racinaires de plusieurs espèces cultivées en association, un tri des racines des différentes espèces est aussi nécessaire. Ce tri se base alors sur des critères morphologiques (couleur, texture, mode d'enracinement) si les espèces peuvent être distinguées sur base de tels critères ou par l'utilisation de colorants, de radio-

isotopes, ou encore d'analyses d'ADN (Rewald et al., 2012; Li et al., 2006; Hauggaard-Nielsen & Jensen, 2005).

Afin de réduire le temps et la pénibilité du tri des échantillons avant la quantification des racines, nous avons étudié les potentialités offertes par l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge et les modèles chimiométriques pour la discrimination des différents éléments présents au sein de ces échantillons de sol ainsi que pour leur quantification.

L'imagerie hyperspectrale proche infrarouge résulte de la combinaison des technologies de l'imagerie et de la spectroscopie proche infrarouge. Utilisée seule, la spectroscopie proche infrarouge est une méthode d'analyse qui permet l'acquisition du spectre proche infrarouge propre à un échantillon. Ce spectre peut être considéré comme la signature spectrale de l'échantillon. Cette méthode permet donc l'acquisition d'informations chimiques et a de nombreux avantages: la facilité d'utilisation, la possibilité d'analyser rapidement et simultanément différents composants sans devoir utiliser de réactif et sans détruire l'échantillon (Dale et al., 2013; Fernández Pierna et al., 2012). L'analyse des spectres permet également de classer ou d'identifier des matériaux sans être influencé par la subjectivité humaine (Dale et al., 2013; Fernández Pierna et al., 2004).

Au cours des 30 dernières années, la spectroscopie a été utilisée de plusieurs façons pour étudier les systèmes racinaires. Elle fut utilisée pour estimer les proportions de biomasses racinaires au sein de mélanges de racines (Roumet et al., 2006; Rumbaugh et al., 1988), déterminer les taxons d'espèces herbagées ou forestières (Rewald & Meinen, 2013), discriminer des racines d'avoine et de pois (Naumann et al., 2010) et pour prédire, au sein d'un échantillon de racines de graminées, le pourcentage de racines vivantes ou mortes (Picon-Cochard et al., 2009). Kusumo et al. (2011 et 2010) ont également utilisé la spectroscopie proche infrarouge, dans leur cas directement au champ, pour estimer rapidement la densité racinaire de maïs et de pâtures au sein de carottes de sol sans devoir séparer les racines du sol.

Toutes ces méthodes d'analyse spectroscopiques étaient basées sur l'étude du spectre moyen des échantillons analysés. Avec l'imagerie hyperspectrale, la combinaison de l'imagerie et de la spectroscopie permet d'acquérir simultanément des données spectrales et spatiales. Avec cette nouvelle technologie, chaque pixel d'une image hyperspectrale contient l'entièreté du spectre proche infrarouge ce qui permet de l'utiliser pour caractériser la composition des régions de l'image (Shahin et al., 2014). Cette technologie est souvent utilisée pour contrôler la composition, la qualité et la sécurité de produits agricoles (Dale et al., 2013; Wang & Paliwal, 2007; Fernández Pierna et al., 2006).

Tout comme la spectroscopie classique, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge est une méthode indirecte. La calibration de modèles de discrimination ou de régression est donc nécessaire pour obtenir des analyses qualitatives ou quantitatives (Dale et al., 2013). La calibration de ces modèles est rendue possible grâce aux outils de la chimiométrie qui permettent l'extraction des informations pertinentes des mesures effectuées par utilisation d'algorithmes mathématiques et statistiques (Massart et al., 1988 cité par Dale et al., 2012).

Dans le cadre de cet article, nous présentons deux cas d'études où l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a été utilisée pour quantifier le développement racinaire de cultures. Dans le premier cas, l'effet du travail du sol sur le

développement du système racinaire du froment d'hiver (*Triticum aestivum* L.) a été étudié. Dans le second cas d'étude, les effets de la fumure azotée et de la culture en association du froment d'hiver et du pois protéagineux d'hiver (*Pisum sativum* L.) ont été étudiés sur le développement racinaire de ces deux cultures. Les effets du travail du sol et de l'association de cultures sont deux sujets qui soulèvent de nombreuses questions. Si le nombre d'études menées en conditions de plein champ sur les effets du travail du sol et de la fertilisation sont en augmentation, la manière dont ces pratiques affectent le développement racinaire n'est pas encore parfaitement comprise (Rasmussen et al., 2015; Wang et al., 2014; Huang et al., 2012; Muñoz-Romero et al., 2010; Munkholm et al., 2008). Il en va de même pour l'effet de l'association de cultures (Li et al., 2006; Hauggaard-Nielsen & Jensen, 2005).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Echantillonnage

Les échantillons de racines ont été prélevés dans des essais réalisés au champ à l'aide d'une sonde de 3 cm de diamètre enfoncée dans le sol à l'aide d'un vérin hydraulique monté à l'avant d'un tracteur. Les prélèvements ont été réalisés sur 30 cm de profondeur et ont été fractionnés en 3 horizons de 10 cm. Pour chaque échantillon de sol, 5 prélèvements étaient rassemblés. Les échantillons ont été mis dans des sacs en plastique et gardés à 4°C en attendant leur traitement.

### 1.2. Lavage des échantillons

Les échantillons de sol ont été lavés à l'eau afin d'en extraire les racines. Lors de ce lavage, d'autres éléments ont été extraits avec les racines tels que des résidus de la culture précédente ou de petits cailloux. Afin de faciliter la désagrégation du sol, les échantillons de sol ont été préalablement immergés durant 48 h dans une solution contenant 50 g NaCl par litre d'eau. Les éléments récupérés lors du lavage ont été étendus sur un grillage à fine maille (type moustiquaire) et séchés à l'étuve (60°C durant 48 h).

### 1.3. Acquisition des images hyperspectrales

Les images hyperspectrales en proche infrarouge ont été acquises selon la même méthode que celle décrite par Vermeulen et al. (2012). La caméra hyperspectrale permettant l'acquisition de spectres proche infrarouge est positionnée au-dessus d'une bande transporteuse (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie) (Figure 1). Le système projette un faisceau de lumière sur une matrice à plan focal à deux dimensions. Chaque image hyperspectrale est acquise à 209 longueurs d'ondes (1118-2425 nm) avec une résolution spectrale d'environ 6.3 nm et sur 320 pixels de large. L'image hyperspectrale fournit un spectre pour chaque pixel, chaque spectre étant le résultat moyen de 32 mesures d'absorbance. Les images ont été acquises avec un objectif couvrant une plage de 10 cm de large sur la bande transporteuse. Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel HyperProVB (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie). La vitesse d'avancement de la bande transporteuse a été adaptée de telle manière à avoir toujours des pixels de forme carrée. Afin de faciliter les manipulations, les échantillons ont été placés sous la caméra avec le grillage utilisé lors du séchage. Les échantillons ont été disposés de telle manière à ne pas dépasser de la plage de mesure de la caméra. Ils ont été partiellement étendus afin de

limiter autant que possible le recouvrement des éléments (Figure 2).

### 1.4. Discrimination des spectres proche infrarouge

Les différents éléments présents sur les images hyperspectrales ont été regroupés en quatre classes spectrales. Dans le premier cas d'étude, ces classes étaient constituées des spectres i) du grillage, ii) des particules de sol et des cailloux restants après le lavage, iii) des résidus de la culture précédente et iv) des racines de froment. Dans le second cas d'études, une seule classe regroupait les spectres du grillage, des particules de sol, des cailloux et des résidus de la culture précédente. Les trois autres classes étaient constituées des spectres des racines de pois, des racines de froment et des nodosités. Ces différentes classes spectrales ont été discriminées grâce à un arbre de classification dichotomique comprenant trois algorithmes d'analyse discriminante selon la même méthode que celle utilisée par Fernández Pierna et al. (2012). Les algorithmes utilisés sont basés sur les Séparateurs à Vastes Marges (SVM). Ces algorithmes sont une méthode chimiométrique dont l'objectif est de trouver l'hyperplan maximisant la distance entre deux groupes prédéfinis de données en minimisant les erreurs de classification (Fernández Pierna et al., 2004; Cornuéjols, 2002).



**Figure 1** - Système d'acquisition des images hyperspectrales proche infrarouge (BurgerMetrics SIA, Riga, Lettonie). L'échantillon qui est éclairé par deux spots halogènes est posé sur une bande transporteuse et passe sous la caméra.



**Figure 2** - Racines de froment, racines de pois, nodosités, fragments de pailles, particules de terre et cailloux extraits d'un échantillon de sol, étendus sur le grillage de support et posés sur le tapis de mesure de la caméra hyperspectrale proche infrarouge. Les éléments sont disposés de telle manière à éviter tant que possible qu'ils se recouvrent. Un spectre proche infrarouge va être acquis pour chaque pixel de l'image.

Vu la grande variation de l'absorbance aux extrémités du spectre proche infrarouge acquis, seules les 150 longueurs d'ondes comprises entre 1432 et 2368 nm ont été utilisées pour la calibration des algorithmes et la prédiction de la nature des pixels. Une élimination des spectres aberrants a également été réalisée avant la sélection des spectres utilisés pour la calibration. La calibration des modèles utilisés dans les deux cas d'étude est basée sur une sélection d'environ 9000 et 6000 spectres respectivement. Ces spectres ont été sélectionnés de manière à contenir un maximum de variabilité pour chaque classe spectrale des modèles.

### 1.5. Quantification des racines

La quantification des racines présentes dans chaque échantillon de sol a été réalisée grâce à la relation linéaire qui existe entre le nombre de pixels classé par les modèles de discrimination comme étant des racines sur l'image hyperspectrale et la masse de racines présentes dans cet échantillon. Les équations utilisées dans les deux cas d'études ont été construites sur base d'images hyperspectrales d'échantillons de racines dont la masse avait été préalablement mesurée. La quantité de pixels de racines présentes sur l'image hyperspectrale étant influencée par la manière dont l'échantillon est présenté devant la caméra et par le pourcentage de recouvrement des racines entre elles, au moins deux images ont été prises par échantillon utilisé pour la construction des équations. Entre chaque prise d'image, la disposition des racines sous la caméra était modifiée de sorte à avoir une densité de racine par cm<sup>2</sup> différente entre chaque image.

### 1.6. Traitement des données et des résultats

La calibration des modèles de discrimination a été réalisée à l'aide de la PLS Toolbox 7.8 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, USA). Le logiciel Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) a servi pour le traitement des spectres proche infrarouge et pour la classification des pixels des images hyperspectrales. L'analyse statistique des résultats de la quantification de la densité racinaire a été réalisée grâce au logiciel R (R Core Team, 2017). Le package "agricolae" a été utilisé pour les analyses de la variance (ANOVA) et les tests de Student-Newman-Keuls (Mendiburu and Simon, 2015).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Cas d'étude 1: Quantification de racines de froment sous labour ou travail superficiel

Dans ce premier cas d'étude, l'objectif était de mesurer l'effet du travail du sol sur le développement du système racinaire du froment d'hiver. Les échantillons de sol ont été prélevés au sein de l'essai SOLRESIDUS mis en place en 2008 par Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège, Belgique) et décrit par Degrune et al. (2016). Cet essai a pour objectif d'étudier les effets de différents modes de gestion des résidus de culture: le labour conventionnel sur 25 cm de profondeur ou le travail superficiel réalisé sur une profondeur de 10 cm avec un outil à dents et à disques, avec ou sans restitution des résidus de culture. La culture de froment d'hiver sous laquelle les prélèvements de sol ont été réalisés avait été implantée le 11 octobre 2011. Les prélèvements de sol ont été réalisés un mois après le semis, le 17 novembre 2011, et le 8 mai 2012 au stade phénologique "2 nœuds" de la culture (stade 32 sur l'échelle

BBCH améliorée de Hack et al., 1992). Pour chaque modalité de travail du sol, deux échantillons de sol ont été prélevés dans chacune des quatre répétitions de l'essai à raison d'un échantillon dans la ligne de culture et un autre dans l'interligne.

Avant de quantifier les racines présentes dans les échantillons de sol, il fallait pouvoir discriminer ces racines des résidus de la culture précédente (du froment) et des particules de sol également présents dans les échantillons de sol. La validation des modèles permettant la discrimination de ces différentes classes a été réalisée sur des spectres indépendants de ceux utilisés pour la calibration des modèles. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1 et sont exprimés en termes de sensibilité (pourcentage de spectres correctement classés dans la première classe du modèle de discrimination) et de spécificité (pourcentage de spectres correctement classés dans la seconde classe du modèle de discrimination) (Fernández Pierna et al., 2012). Une seconde validation a été réalisée en appliquant les modèles de discrimination sur des images de racines de froment (Tableau 2).

**Tableau 1** – Validation sur spectres proche infrarouge des trois modèles permettant la discrimination des racines du froment, des résidus de la culture précédente (froment), des particules de sol restantes après lavage de l'échantillon et du tamis permettant la manipulation de l'échantillon. Validation réalisée pour chaque modèle séparément sur une sélection de spectres différents de ceux utilisés pour la calibration des modèles. Les résultats sont exprimés en termes de sensibilité (pourcentage de spectres correctement classés dans la première classe du modèle de discrimination) et de spécificité (pourcentage de spectres correctement classés dans la seconde classe du modèle de discrimination).

	Sensibilité	Spécificité
Tamis vs. Reste	94.9 %	95.7 %
Particules de sol vs. Reste	99.2 %	99.7 %
Résidus vs. Racines froment	94.1 %	85.9 %

**Tableau 2** - Validation des modèles de discrimination permettant la discrimination des résidus de la culture précédente (froment) et des racines de froment. Validation réalisée en appliquant la succession des trois modèles de discrimination sur des images hyperspectrales acquises sur des échantillons contenant uniquement des résidus de la culture de froment ou des racines de froment. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage moyen de pixels classés par les modèles de discrimination dans les différentes classes spectrales. Le pourcentage de pixels correctement classé est en caractère gras.

Image (nombre)	Classification des spectres (Moyenne ± écart-type)	
	Résidus	Racines froment
Résidus (131)	<b>81 ± 8 %</b>	17 ± 6 %
Racine froment (117)	8 ± 6 %	<b>91 ± 5 %</b>

Les résultats obtenus lors de la validation de ces modèles ont montré une bonne classification des spectres dans chaque classe. Une confusion apparaît néanmoins entre les spectres de racines de froment et les résidus de culture. Cette confusion apparaît principalement en bordure des résidus de

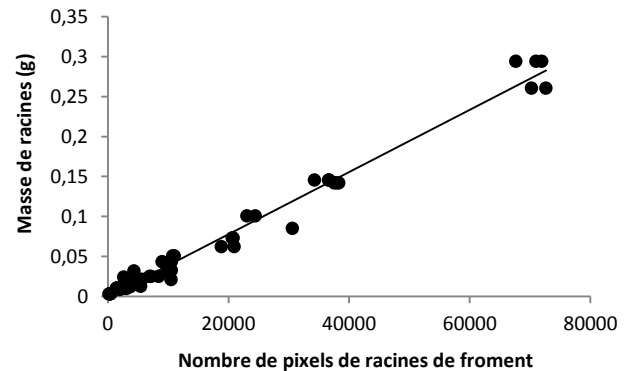
culture lors de l'application des modèles de discrimination sur les images hyperspectrales. Elle pourrait s'expliquer par le bruit présent au niveau des spectres de racines. Celle-ci ayant un diamètre bien souvent inférieur à la taille du pixel (0.3 mm), leur spectre est probablement influencé par l'arrière-plan de l'image, tout comme les pixels se trouvant en bordure des résidus de culture.

Sur base du nombre de pixels prédits comme étant des racines de froment sur les images hyperspectrales acquises sur les échantillons, une quantification de la masse de racines présentes au sein de l'échantillon a pu être réalisée grâce à l'Equation 1. Cette relation, illustrée à la Figure 3, a été construite sur base du nombre de pixels prédits comme étant des racines de froment sur des images acquises sur des échantillons de masse connue. Cette équation est donc strictement liée aux modèles d'analyse discriminante calibrés dans le cadre de la présente étude. La masse de racine calculée a ensuite été divisée par le volume de terre échantillonné (0.353 dm<sup>3</sup>) afin d'exprimer les résultats en termes de densité de racine (g) par volume de sol (dm<sup>3</sup>).

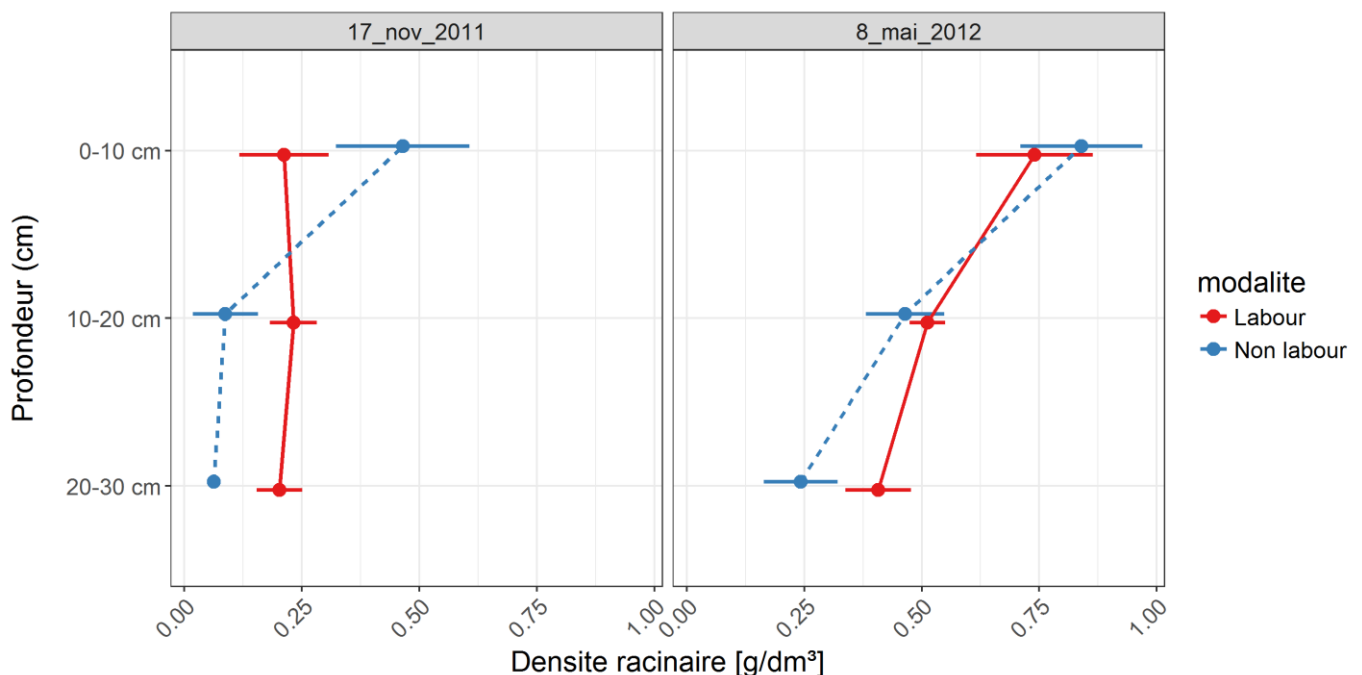
**Équation 1** - Quantification de la masse de racines de froment (g) en fonction du nombre de pixels classés dans cette classe spectrale par les modèles d'analyse discriminante calibrés dans le cadre de l'étude (R<sup>2</sup> = 0.98).

$$\text{Masse racines} = \frac{\text{Nombre de pixels de racines}}{254435}$$

La Figure 4 présente les résultats obtenus suite à l'application des modèles de discrimination sur les images hyperspectrales acquises sur les échantillons prélevés dans l'essai sur le travail du sol et dont le nombre de pixels prédit comme étant des racines a été converti en termes de densités racinaires. Cette figure présente, pour chaque date de prélèvement et pour les deux intensités de travail du sol, la densité racinaire calculée sur les trois horizons de sol échantillonnés.



**Figure 3** - Relation linéaire reliant la masse (g) d'échantillons composés uniquement de racines de froment et le nombre de pixels classé, par les modèles de discrimination calibrés pour cette étude, comme étant des racines de froment sur les images hyperspectrales.



**Figure 4** - Densités racinaire (g/dm<sup>3</sup>) d'une culture de froment d'hiver calculée dans trois horizons de sol (0-10, 10-20 et 20-30 cm) sur base d'images hyperspectrales prises en proche infrarouge sur des échantillons de sol lavés. Les échantillons ont été prélevés un mois après le semis de la culture (17 novembre 2011) et lorsque la culture était au stade phénologique "2 nœuds" (8 mai 2012) dans un essai comparant les effets du labour sur 25 cm de profondeur (trait continu) et un travail superficiel sur 10 cm de profondeur (non labour; trait discontinu). La densité racinaire est statistiquement différente en labour et non labour le 17 novembre dans les trois horizons de sol. Le 8 mai, une différence de densité racinaire fut observée entre les deux modes de travail du sol dans l'horizon de sol 20-30 cm. En labour, aucune différence de densité racinaire n'a été observée entre les trois horizons de sol et cela aux deux dates de prélèvement.

L'analyse statistique des résultats a montré une répartition homogène des racines sur l'entièreté du profil étudié (30 cm)

pour le labour et cela pour les deux dates de prélèvement. Avec le travail superficiel, la densité racinaire un mois après le

semis est plus élevée qu'en labour dans l'horizon supérieur et moins élevée entre 10 et 30 cm de profondeur. Ces résultats montrent que selon la profondeur du travail du sol, le froment développe préférentiellement son système racinaire dans l'horizon ameubli et descend donc plus ou moins vite en profondeur. Six mois plus tard, lors du prélèvement réalisé au stade "2 nœuds" de la culture de froment, les densités racinaires sont équivalentes dans les deux horizons supérieurs mais la densité racinaire entre 20 et 30 cm reste plus faible en travail superficiel. Il est néanmoins intéressant de remarquer qu'aux deux dates de prélèvement, la densité moyenne de racines sur 30 cm était statistiquement égale pour les deux modalités de travail du sol. Le travail du sol influencerait donc la distribution des racines dans le sol mais pas la quantité totale produite. Cette affirmation devrait cependant être vérifiée sur l'entièreté du système racinaire du froment qui se développe jusqu'à une profondeur de 1.5-2 m (Rasmussen et al., 2015) ce qui n'a pas été fait dans le cadre de cette étude.

## 2.2. Cas d'étude 2: Quantification de racines de froment et de pois en culture associée.

Dans ce second cas d'étude, les racines ont été prélevées le 28 juin 2016 dans un essai sur la fertilisation de cultures associées de froment d'hiver et de pois protéagineux d'hiver. Cet essai, réalisé à Gembloux (Belgique) dans un sol limoneux à drainage favorable après une culture de froment d'hiver, comprenait des parcelles de froment d'hiver et de pois protéagineux cultivés seuls ou en association. A cette date, la culture de froment était au stade "grain mi-laiteux" (BBCH 73) et les graines de pois étaient complètement formées (BBCH 79). La fumure avait été apportée en deux fractions aux stades phénologiques du froment "fin tallage-début redressement" (BBCH 30) et "dernière feuille" (BBCH 39). Les échantillons ont été prélevés au sein de quatre modalités de fumure: soit aucun apport d'azote (0-0), soit un apport d'azote de 40 kg/ha appliqué au stade "tallage-redressement" de la culture de froment suivi d'un second apport de 40 kg/ha (40-40), 80 kg/ha (40-80) ou 120 kg/ha (40-120) au stade "dernière feuille". Quatre échantillons de sol ont été prélevés pour chaque modalité: deux parcelles ont été échantillonnées à raison de deux échantillons de sol par parcelle. Les échantillons ont été prélevés dans l'interligne de la culture.

Les modèles de discrimination mis au point permettaient d'extraire successivement les spectres proche infrarouge rassemblés en quatre classes: i) le tamis sur lequel était posé l'échantillon + les éléments du sol (terre et cailloux) + les résidus de la culture précédente (froment), ii) les racines de pois, iii) les racines de froment, iv) les nodosités de pois. La qualité de la discrimination de ces quatre classes spectrales a été évaluée sur des spectres différents de ceux utilisés pour la calibration des modèles. La qualité des modèles a également été étudiée en appliquant les modèles sur des images ne contenant que des racines de pois ou de froment d'hiver et en calculant le pourcentage moyen de pixels correctement classés. Les résultats de ces validations sont donnés dans les Tableaux 3 et 4.

Les résultats de la validation sur spectres montrent une excellente discrimination des racines de froment et des nodosités ce qui se confirme lors de la validation sur images. La discrimination des spectres de la première classe (tamis, particules de sol et résidus de la culture précédente) est bonne. Une analyse plus en profondeur des résultats a mis en évidence une excellente discrimination du tamis et des

particules de sol et une certaine confusion entre les spectres de résidus et de racines des deux cultures. La confusion la plus importante se situe entre les racines de froment et de pois avec néanmoins un pourcentage de bonne classification proche de 80 % obtenu aussi bien lors de la validation sur spectres que lors de la validation sur images hyperspectrales.

Tout comme dans le cas de l'étude précédente, la confusion entre les résidus de la culture précédente et les racines, dans ce cas-ci des cultures de froment et de pois, apparaît principalement en bordure des résidus. Elle peut donc à nouveau être expliquée par le fait que les spectres acquis dans cette zone sont influencés par l'arrière-plan et ne correspondent donc pas exactement au profil des spectres utilisés pour la calibration des modèles. Il en va de même pour la confusion entre les racines des deux cultures qui, de par leurs tailles, ont des spectres fortement influencés par l'arrière-plan. L'analyse des spectres moyens de ces trois classes spectrales et des nodosités, calculés sur l'ensemble des spectres utilisés pour la calibration des modèles (1100 spectres de résidus de froment, 1100 spectres de racines de pois, 1098 de racines de froment, 300 de nodosités) montre par ailleurs une parfaite discrimination de ces spectres moyens (Figure 5). La confusion des spectres des différentes classes n'est donc pas due à la nature chimique des classes mais à la manière dont les spectres sont acquis et à la diversité des spectres présents au sein de chaque classe spectrale.

**Tableau 3** - Validation sur spectres proche infrarouge des trois modèles permettant la discrimination de racines de froment et de pois, de nodosités, de résidus de la culture de froment, de particules de sol restantes après lavage de l'échantillon et du tamis permettant la manipulation de l'échantillon. Validation réalisée pour chaque modèle séparément sur une sélection de spectres différents de ceux utilisés pour la calibration des modèles. Les résultats sont exprimés en termes de sensibilité (pourcentage de spectres correctement classés dans la première classe du modèle de discrimination) et de spécificité (pourcentage de spectres correctement classés dans la seconde classe du modèle de discrimination).

	Sensibilité	Spécificité
(Tamis + sol + résidus) vs. Reste	89 %	89 %
Racines pois vs. Reste	78 %	83 %
Racines froment vs. Nodosités	99 %	96 %

**Tableau 4** - Validation des modèles de discrimination permettant la discrimination de racines de froment et de pois. Validation réalisée en appliquant la succession des trois modèles de discrimination sur des images hyperspectrales acquises sur des échantillons contenant uniquement des racines de pois ou des racines de froment. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage moyen de pixels classés par les modèles de discrimination dans les différentes classes spectrales. Le pourcentage de pixels correctement classé est en caractère gras.

Images (nombre)	Classification des spectres (Moyenne ± écart-type)		
	Racines pois	Racines froment	Nodosités
<b>Racine pois (27)</b>	<b>75 ± 9 %</b>	24 ± 9 %	1,1 ± 0.4 %
<b>Racine froment (32)</b>	14 ± 6 %	<b>86 ± 6 %</b>	0 ± 0 %

La conversion en masse du nombre de pixels classé comme étant des racines de froment ou de pois par les modèles d'analyse discriminante calibrés pour cette étude a été réalisée grâce aux Equations 2 et 3. La Figure 6 présente les densités racinaires calculées dans les horizons de sol échantillonnés pour les cultures de froment et de pois cultivées seules ou en association selon quatre niveaux de fumure azotées.

**Équation 2** - Quantification de la masse de racines de pois (g) en fonction du nombre de pixels classés dans cette classe spectrale par les modèles d'analyse discriminante calibrés dans le cadre de l'étude ( $R^2 = 0.76$ ).

$$\text{Masse racines pois} = \frac{\text{Nombre pixels racines pois} + 3486.7}{426825}$$

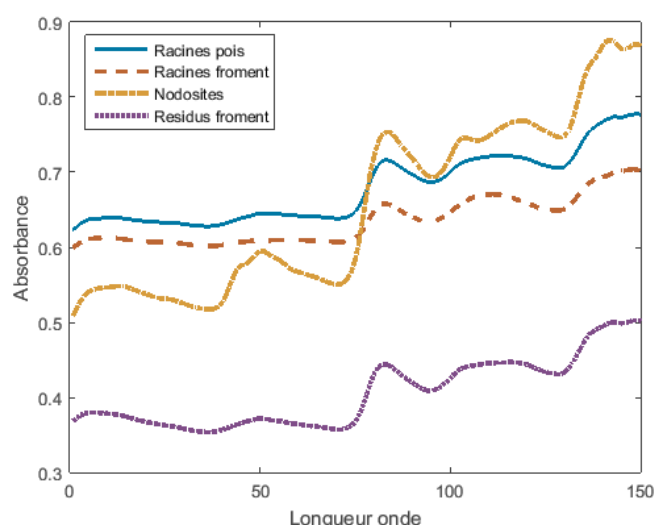
**Équation 3:** Quantification de la masse de racines de froment (g) en fonction du nombre de pixels classés dans cette classe spectrale par les modèles d'analyse discriminante calibrés dans le cadre de l'étude ( $R^2 = 0.89$ ).

$$\text{Masse racines froment} = \frac{\text{Nombre pixels racines froment} - 6846.2}{233817}$$

Une première analyse de ces résultats fait apparaître une forte variabilité des densités calculées ce qui rend l'analyse des données difficile. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs liés aux méthodes d'échantillonnage, d'acquisition des images et de classification des spectres.

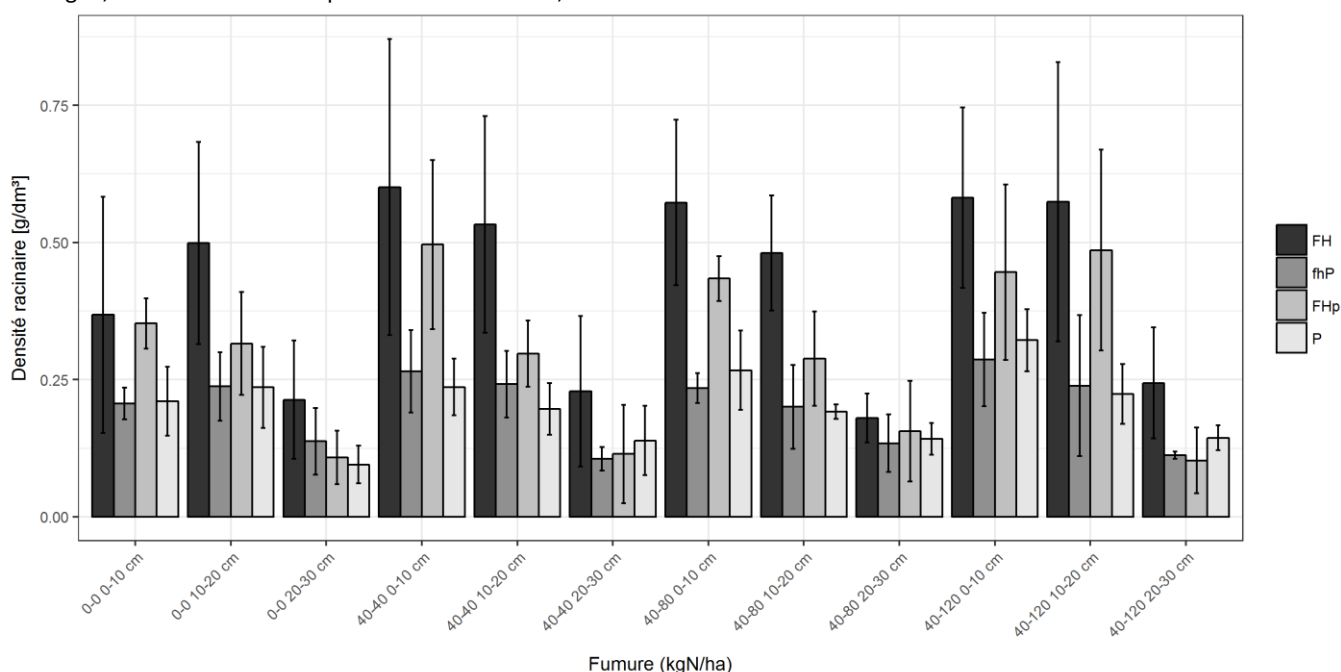
Concernant l'échantillonnage, un échantillon de sol était constitué dans ce second cas d'étude de 5 carottes de sol prélevées dans l'interligne de la culture. Sachant que la densité racinaire sous la ligne de semis peut être plus élevée (Li et al., 2006), le prélèvement de carottes de sol dans la ligne et l'interligne, comme dans le premier cas d'étude, aurait

probablement permis de mieux caractériser la densité racinaire de la culture.



**Figure 5** - Spectres moyens de racines de pois et de froment, de résidus de culture de froment et de nodosités de pois acquis en proche infrarouge. Valeurs d'absorbances pour 150 longueurs d'ondes comprises entre 1432 et 2368 nm.

Au niveau de l'acquisition des images, plus un échantillon contient des éléments, plus le risque de recouvrement entre eux est élevé. Un meilleur étalement de l'échantillon sur la bande transporteuse permettrait donc d'avoir une quantification plus précise du volume racinaire présent dans l'échantillon de sol mais entraînerait une augmentation du temps nécessaire à son traitement. Un juste compromis doit donc être trouvé.



**Figure 6** - Densités racinaires ( $\text{g}/\text{dm}^3$ ) de cultures de froment d'hiver cultivé seul (FH) ou en association (FHp) et de pois cultivé seul (P) ou en association (fhP). Ces densités ont été calculées sur base d'images hyperspectrales acquises en proche infrarouge sur des échantillons de sol lavés. Les échantillons ont été prélevés le 28 juin 2016 dans 3 horizons de sol (0-10, 10-20 et 20-30 cm) dans des cultures menées selon 4 fertilisations azotées contrastées: soit aucune fertilisation (0-0), soit un apport d'azote de 40 kg/ha appliqué au stade "tallage-redressement" de la culture de froment suivi d'un second apport de 40 kg/ha (40-40), 80 kg/ha (40-80) ou 120 kg/ha (40-120) au stade "dernière feuille".

Enfin, pour la classification des spectres, la confusion observée sur les images hyperspectrales entre les spectres de racines de froment et de pois entraîne une sous-estimation de la quantité de racines dans les échantillons prélevés dans les cultures pures et un biais pour les échantillons contenant des racines des deux cultures. Ce biais n'est pas mesurable pour chaque image séparément mais peut être estimé en moyenne sur les images acquises sur des échantillons purs tels que ce fut fait pour la validation sur images des modèles d'analyse discriminante. Nous avons alors calculé qu'en moyenne 24 % des pixels de racines de pois étaient classés comme étant du froment et que 14 % des pixels de racines de froment étaient classés comme étant des racines de pois.

Malgré une forte variabilité des valeurs calculées, les résultats obtenus donnent plusieurs informations intéressantes sur les densités racinaires de cet essai. Ils montrent clairement que la densité racinaire de pois est identique lorsque cette culture est cultivée seule ou en association et cela malgré une densité de semis adaptée (80 grains/m<sup>2</sup> en culture pure, 50 grains/m<sup>2</sup> en culture associée). L'analyse statistique n'a pas non plus montré de différence significative de densité racinaire entre le froment cultivé seul et en association. La densité du froment d'hiver ayant également été adaptée lors du semis en association (150 grains/m<sup>2</sup> au lieu de 300 grains/m<sup>2</sup> en culture pure), nous pouvons donc conclure à un meilleur développement des systèmes racinaires des deux cultures conduites en association. La densité racinaire totale de la culture en association, calculée pour chaque modalité de fertilisation sur 30 cm de profondeur, n'a néanmoins jamais dépassé significativement la densité racinaire calculée en froment pur. La densité racinaire de pois cultivé seul était par contre toujours inférieure à celles du froment ou de l'association des cultures.

Au niveau de la culture de froment, un effet significatif de la profondeur a été observé sur la densité racinaire. La densité racinaire calculée dans l'horizon supérieur du sol était plus élevée que celle calculée entre 20 et 30 cm de profondeur. Ceci est observable systématiquement pour le froment cultivé en association, quel que soit la fumure azotée apportée. Dans le cas des fertilisations 0-0 et 40-120, la densité racinaire du froment associé était égale dans les deux horizons supérieurs alors que dans les deux autres modalités de fertilisation, la densité racinaire est statistiquement différente dans les trois horizons de sol. En froment pur, une différence de densité entre les horizons n'est observée que pour la modalité de fertilisation 40-80. Dans le cas du pois, cultivé seul ou en association, l'effet de la profondeur sur la densité racinaire est moins marqué mis à part pour le pois cultivé seul avec la fertilisation 40-120 pour lequel il y a une nette différence entre les trois horizons étudiés.

Aucun effet significatif de la fertilisation azotée n'a pu être mis en évidence sur la densité racinaire totale sur 30 cm de profondeur pour les deux cultures, qu'elles soient cultivées seules ou en association, bien qu'une tendance à l'augmentation des densités racinaires du froment soit observée lorsque la quantité d'azote apportée augmente.

## **DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS**

La méthode de quantification de racines basée sur l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge a montré dans ces deux cas d'étude ses avantages et ses limitations. Par

rapport au tri manuel généralement utilisées pour séparer les racines des résidus de culture, l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale prend moins de temps ce qui permet de traiter un plus grand nombre d'échantillons sur un même laps de temps et donc de répéter plus facilement les mesures. De plus, elle est beaucoup moins fastidieuse pour l'opérateur et elle n'est pas influencée par sa subjectivité.

Pour le classement de racines d'espèces différentes, l'imagerie hyperspectrale proche infrarouge est moins onéreuse que l'utilisation d'isotopes (Rewald et al., 2012) et semble beaucoup moins laborieuse que la technique de microscopie permettant la discrimination des espèces sur base de l'analyse morphologique et anatomique de la section transversale des racines utilisée par Ramirez-Garcia et al. (2015).

Par rapport à la spectroscopie proche infrarouge classique qui fut déjà utilisée à plusieurs reprises dans l'étude de systèmes racinaires (Meinen & Rauber, 2015; Roumet et al., 2006; Rumbaugh et al., 1988), la combinaison avec l'imagerie permet de ne plus mesurer des valeurs relatives (telles que les proportions de racines de différentes espèces au sein d'un échantillon) mais de pouvoir calculer directement des masses de racines sur base de la relation existant entre la quantité de pixels présents sur l'image hyperspectrale et la masse de l'échantillon.

Dans les deux cas d'études présentés, cette nouvelle méthode de quantification a permis de mettre très clairement en évidence l'effet du travail du sol sur la densité racinaire du froment, l'absence d'effet de la fumure azotée sur la densité racinaire du pois cultivé seul ou en association et des différences significatives de densité racinaire du froment entre les trois horizons de sol étudiés. La bonne classification des spectres des résidus de culture et de nodosités aurait également pu permettre de quantifier ces éléments dans ces deux cas d'études afin d'étudier l'effet du travail du sol sur la répartition et la dégradation des résidus de culture ainsi que l'effet de la fumure azotée sur le développement des nodosités de pois.

Néanmoins, cette méthode de quantification de racines comporte encore un certain nombre de biais qui influencent le calcul de la quantité de racines présente dans un échantillon. Lors de l'acquisition des images, une partie de l'information peut être perdue par manque de séparation des éléments de l'échantillon (racines, résidus de culture...). Avec les réglages de la caméra utilisés pour ces études, la largeur de la plage d'acquisition des spectres était de 10 cm. L'échantillon devait être dispersé sur cette largeur de telle manière à limiter le recouvrement des éléments. Lors de l'analyse des images, la confusion des spectres appartenant aux différentes classes des modèles induit un second biais dans la quantification des éléments de l'échantillon. Enfin, la quantité finale de racine calculée dépend aussi de la qualité de la relation linéaire permettant de convertir en termes de masse le nombre de pixels classés comme étant des racines. Il est donc nécessaire d'utiliser d'un grand nombre d'échantillons pour la calibration de cette relation.

Une meilleure répartition des éléments sur le tapis de mesure lors de l'acquisition des images, l'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons pour la calibration des modèles de discrimination et des droites de régression ainsi qu'une meilleure prise en compte des ombres et des effets de bordures, qui influencent la qualité de la discrimination des spectres, devraient permettre à l'avenir d'améliorer encore



cette nouvelle méthode d'étude des systèmes racinaires.

Dans l'état actuel de son développement, cette méthode ne doit donc pas être utilisée en espérant avoir une quantification précise des racines présentes au sein d'un échantillon mais comme une méthode permettant d'obtenir des valeurs relatives permettant la comparaison de densités racinaires au

sein de systèmes de culture ou d'horizons de sol différents et cela de manière plus rapide et moins fastidieuse que par la méthode de tri manuel et de pesée couramment utilisée avec le prélèvement de carottes de sol dans les études sur le développement de systèmes racinaires en conditions de plein champ.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cai H. et al., 2014. Effect of subsoil tillage depth on nutrient accumulation, root distribution, and grain yield in spring maize. *Crop J*, 2(5), pp.297–307.
- Cheng W., Coleman D.C. & Box J.E., 1990. Root dynamics, production and distribution in agrosystems on the Georgia Piedmont using minirhizotrons. *J Appl Ecol*, 27(2), pp.592–604.
- Cornuéjols A., 2002. Une nouvelle méthode d'apprentissage: Les SVM. Séparateurs à vaste marge. *Bulletin de l'AFIA*, 51.
- Dale L.M. et al., 2012. Chemometric tools for NIRS and NIR Hyperspectral Imaging. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(1), pp.70–76.
- Dale L.M. et al., 2013. Hyperspectral Imaging Applications in Agriculture and Agro-Food Product Quality and Safety Control: A Review. *Appl Spectrosc Rev*, 48(2), pp.142–159.
- Degruene F. et al., 2016. No favorable effect of reduced tillage on microbial community diversity in a silty loam soil (Belgium). *Agr Ecosyst Environ*, 224, pp.12–21.
- De Mendiburu F., Simon R. (2015) *Agricolae* - Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. *PeerJ PrePrints*.
- Fernández Pierna J.A. et al., 2004. Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J Chemometr*, 18(7–8), pp.341–349.
- Fernández Pierna J.A. et al., 2012. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. *Chemometr Intell Lab*, 117, pp.233–239.
- Fernández Pierna J.A., Baeten V. & Dardenne P., 2006. Screening of compound feeds using NIR hyperspectral data. *Chemometr Intell Lab*, 84 (1–2), pp.114–118.
- Hack H. et al., 1992: Einheitliche Codierung der hänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – Erweiterte BBCH-Skala, *Allgemein. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 44, 265-270.
- Hauggaard-Nielsen H. & Jensen E.S., 2005. Facilitative root interactions in intercrops. *Plant and Soil*, 274(1–2), pp.237–250.
- Huang G. -b. et al., 2012. Effects of different tillage systems on soil properties, root growth, grain yield, and water use efficiency of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in arid northwest China. *J Integr Agric*, 11(8), pp.1286–1296.
- Izumi Y., Uchida K. & Iijima M., 2004. Crop production in successive wheat-soybean rotation with no-tillage practice in relation to the root system development. *Plant Prod Sci*, 7(3), pp.329–336.
- 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 Soil*, 338(1–2), pp.233–245.
- Kusumo B.H. et al., 2010. Predicting pasture root density from soil spectral reflectance: field measurement. *Eur J Soil Sci*, 61(1), pp.1–13.
- Li L. et al., 2006. Root distribution and interactions between intercrop species. *Oecologia*, 147, pp.280–290.
- Naumann A., Heine G. & Rauber R., 2010. Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Field Crops Research*, 119, pp.78–84.
- Majdi H., 1996. Root sampling methods - application and limitations of the minirhizotron technique. *Plant Soil*, 185, pp.255–258.
- Meinen C. & Rauber R., 2015. Root discrimination of closely related crop and weed species using FT MIR-ATR spectroscopy. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), pp.1–13
- Morell F.J. et al., 2011. Root growth of barley as affected by tillage systems and nitrogen fertilization in a semiarid mediterranean agroecosystem. *Agron J*, 103(4), pp.1270–1275.
- Munkholm L.J., Hansen E.M. & Olesen J.E., 2008. The effect of tillage intensity on soil structure and winter wheat root/shoot growth. *Soil Use and Management*, 24(4), pp.392–400.
- Muñoz-Romero V. et al., 2010. Monitoring wheat root development in a rainfed vertisol: Tillage effect. *European Journal of Agronomy*, 33(3), pp.182–187.
- Picon-Cochard C. et al., 2009. Use of near-infrared reflectance spectroscopy to predict the percentage of dead versus living grass roots. *Plant Soil*, 317(1–2), pp.309–320.
- Plaza-Bonilla D. et al., 2014. Winter cereal root growth and aboveground–belowground biomass ratios as affected by site and tillage system in dryland Mediterranean conditions. *Plant Soil*, 374(1–2), pp.925–939.
- Qin R., Stamp, P. & Richner, W., 2004. Impact of tillage on root systems of winter wheat. *Agron J*, 96(6), pp.1523–1530.
- Ramirez-Garcia J. et al., 2015. Intercropping effect on root growth and nitrogen uptake at different nitrogen levels. *Journal of Plant Ecology*, 8(4), pp.380–389.
- Rasmussen I.S., Dresbøll D.B. & Thorup-Kristensen K., 2015. Winter wheat cultivars and nitrogen (N) fertilization-Effects on root growth, N uptake efficiency and N use efficiency. *European Journal of Agronomy*, 68, pp.38–49.
- R Core Team (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rewald B. et al., 2012. Root taxa identification in plant mixtures - current techniques and future challenges. *Plant and Soil*, 359, pp.165–182.

- Rewald B. & Meinen C., 2013. Plant roots and spectroscopic methods - analyzing species, biomass and vitality. *Front Plant Sci*, 4, p.393.
- Roumet C. et al., 2006. Quantifying species composition in root mixtures using two methods: near-infrared reflectance spectroscopy and plant wax markers. *New Phytol*, 170(3), pp.631–638.
- Rumbaugh M.D., Clarck D.H. & Pendery B.M., 1988. Determination of root mass ratios in alfalfa-grass mixtures using near infrared reflectance spectroscopy. *J Range Manage*, 41(6), pp.488–490.
- Shahin M.A., Symons S.J. & Hatcher D.W., 2014. Quantification of mildew damage in soft red winter wheat based on spectral characteristics of bulk samples: a comparison of visible-near-infrared imaging and near-infrared spectroscopy. *Food Bioprocess Tech*, 7(1), pp.224–234.
- Strudley M.W., Green T.R. & Ascough J.C., 2008. Tillage effects on soil hydraulic properties in space and time: State of the science. *Soil and Tillage Research*, 99(1), pp.4–48.
- Vermeulen P. et al., 2012. Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using near infrared hyperspectral imaging. *Food Addit Contam A*, 29(2), pp.232–240.
- Wang W. & Paliwal J., 2007. Near-infrared spectroscopy and imaging in food quality and safety. *Sens Instrum Food Qual Saf*, 1(4), pp.193–207.
- Wang C. et al., 2014. Effects of different irrigation and nitrogen regimes on root growth and its correlation with above-ground plant parts in high-yielding wheat under field conditions. *Field Crops Research*, 165, pp.138–149.