

THÈSE CIFRE

Étude des facteurs influençant la conservation des racines de betteraves sucrières, et des changements physiologiques au cours du stockage en lien avec la qualité industrielle

Par Cécile ROQUES

Établissement : Université Lille Nord de France (Lille 1)

École doctorale : SMRE

(Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement)

Doctorat d'Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Directeur de thèse : Patrice HALAMA

Co-encadrant : Bertrand Vandoorne

Jury :

- M. Alain BOUCHEREAU
- M. Patrice HALAMA
- M. Jean-Louis HILBERT
- M. Maurice NONUS
- M. Philippe SIMONEAU
- M. Bertrand VANDOORNE



Soutenue le : mardi 19 décembre 2017



THÈSE CIFRE

Étude des facteurs influençant la conservation des racines de betteraves sucrières, et des changements physiologiques au cours du stockage en lien avec la qualité industrielle

Par Cécile ROQUES

Établissement : Université Lille Nord de France (Lille 1)

École doctorale : SMRE

(Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement)

Doctorat d'Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Directeur de thèse : Patrice HALAMA

Co-encadrant : Bertrand Vandoorne

Jury :

- M. Alain BOUCHEREAU
- M. Patrice HALAMA
- M. Jean-Louis HILBERT
- M. Maurice NONUS
- M. Philippe SIMONEAU
- M. Bertrand VANDOORNE



Soutenue le : mardi 19 décembre 2017

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à M. Philippe Monceaux, directeur co-produits Tereos, et Mme. Fanny Delval, responsable ressources humaines Tereos, pour m'avoir fait confiance dans la conduite de la thèse.

Merci à M. Monceaux pour son accompagnement et son soutien tout au long de ce travail.

Merci à M. Hervé Nouvellon, directeur agricole, de son soutien, de son appui et de son écoute dans la thèse et pour les perspectives qu'elle engendre.

Mes remerciements ensuite à messieurs Jean-Michel Chassine et Alexis Tordeur pour m'avoir accueillie au sein du service agronomique de Tereos. La motivation et l'énergie nécessaires pour la conduite de la thèse ont été assurées par leur accompagnement, et le travail terrain a été soigné. Merci à Alexis pour son soutien de fin de thèse qui s'est avéré encourageant et réconfortant.

Merci à Ewen Géry, responsable expérimentation, et Adrien Gosset, responsable conservation, pour leur expertise professionnelle et pour m'avoir accompagnée et soutenue pendant cette thèse. Merci à Adrien pour l'accompagnement terrain dont il a fait preuve.

Merci également à l'ensemble de l'équipe agronomique pour leur accueil et nos échanges. Grâce à nos discussions et leurs questions, je me suis enrichie et sentie impliquée dans le travail d'agronome. Grâce à leur aide, les essais de stockage longue durée ont pu être menés à bien.

Mes remerciements aux services betteraviers, particulièrement, à Dominique Ryckeboer, Olivier Dumur, Mathieu Villiers, Gautier Leblanc et Jean-Baptiste Mas. Grâce à leur aide, la logistique des essais agronomiques a été gérée avec succès, et le prélèvement de racines contaminées a pu être réalisé efficacement.

Mes remerciements à mesdames Sofie Frederix et Katlijn Linster pour m'avoir accueillie au sein du service recherche et développement de Tereos. Avec leur accompagnement, mon travail d'analyse laboratoire a été adapté au projet de thèse, et je me suis sentie à ma place au sein de leur équipe.

Un grand merci à Christine Hoerens pour son aide dans les analyses chromatographiques. Elle a su déjouer les mauvais tours des équipements, et se rendre disponible en cas de besoin. Grâce à son expertise, une méthode d'analyse efficace a pu être exploitée dans le cadre de cette thèse.

Un grand merci à l'équipe recherche et développement d'Alost (Belgique) pour leur accueil, leur sympathie et leur soutien. J'ai sincèrement apprécié le travail de laboratoire à leurs côtés.

De chaleureux remerciements à Ciara Meade, doctorante sur la partie procédé industriel de cette thèse. Merci pour sa complémentarité dans notre travail d'équipe. Grâce à son ouverture d'esprit, son adaptabilité et sa confiance en notre binôme, nous avons mené nos travaux avec dynamisme et conviction, en limitant les instants conflictuels. Merci également pour son

amitié. Elle a été d'un appui solide dans les moments de doute qui font partie de la vie d'une doctorante ; et dans les moments difficiles qui font tout simplement partie de la vie.

Merci à Patrice Halama et Bertrand Vandoorne, respectivement directeur et co-encadrant de la thèse. Ils m'ont soutenue et confortée dans la progression de mon travail ; apportée leurs savoirs scientifiques de façon à appuyer certaines idées ; et ont été d'une aide précieuse pour la rédaction du travail accompli. Merci pour leur accompagnement de fin de thèse qui a été d'un soutien solide.

Merci à Mme Karin Sahmer, professeur en statistiques à l'ISA, pour son accompagnement dans le traitement des données collectées et la formation sur le logiciel R (analyse statistique).

Merci également à M. Maurice Nonus, co-encadrant de la thèse de Ciara. Il a su se montrer disponible pour m'aider dans certaines recherches, et me soutenir tout au long de la thèse.

Je remercie chaleureusement mes parents qui m'ont soutenue dans mon parcours scolaire atypique. De l'IUT, en passant par la fac et une école d'ingénieur, finalement le master BioVIGPA, dans lequel j'ai trouvé ma voie : la physiologie végétale. Merci de m'avoir permis d'arriver jusqu'à cette thèse CIFRE, dans laquelle j'ai pu m'épanouir entre le monde industriel, d'agronome, de recherche et d'innovation, de terrain, et aussi universitaire. Cette rédaction a abouti en partie grâce à eux, merci pour le « coup d'élan », et le soutien moral via des « textos » réconfortants.

Merci à ma petite sœur. Même si je n'ai pas été très présente durant ce parcours, grâce à sa compréhension et ses déplacements dans l'Aisne, on a su se retrouver.

Merci à notre famille de la Thiérache, des amis de cœur. Merci pour leur soutien, leur coup de gueule, leur écoute et leur présence. Sans Benoit Ferez, Sylvain et Amélie Prémont, Serge et Isabelle Dagnicourt, cette thèse n'aurait pas été vécue de la même façon.

Merci à Benjamin Compère, ingénieur en performance énergétique chez Tereos. Ses conseils judicieux, son calme et son ouverture d'esprit m'ont apaisés à de nombreuses reprises, et m'ont confortés dans certaines décisions. Merci mon Ben.

Et à celle à laquelle j'ai imposé cet emménagement dans le Nord ; qui sans dire mot, a toujours été présente, m'a ressourcée de ses regards et fait rire de ses maladresses ; m'a procurée ces doses d'évasion indispensables, et rendu jaloux certains de mes proches pour le temps passé ensemble ; merci Kalou.

Et pour finir, de chaleureux remerciements à messieurs Philippe Simoneau et Alain Bouchereau d'avoir accepté d'être les deux rapporteurs de cette thèse. En raison de la confiance qu'ils m'ont accordée dans la réussite du master BioVIGPA, cela me tenait à cœur de les avoir dans mon jury de thèse.

Et merci à M. Hilbert d'avoir accepté de présider ma soutenance.

Sommaire

Liste des abréviations	6
Lexique.....	8
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	15
Introduction	16
Chapitre 1 : Cadre de l'étude.....	19
1) État de l'art.....	19
a. Origines des pertes en sucre au cours du stockage des racines de betteraves sucrières	19
b. Conservation des racines à travers le monde.....	22
i. Amérique	22
ii. Canada	23
iii. Royaume-Uni.....	23
iv. Europe.....	24
c. Facteurs physiologiques	26
i. Structure des racines.....	26
ii. Transport du saccharose : anabolisme et catabolisme	30
iii. Aspect variétal	34
d. Facteurs environnementaux	35
i. Climat	35
ii. Pathogènes des racines.....	37
iii. Récolte.....	37
iv. Sol.....	39
e. Le biocontrôle en faveur du stockage de longue durée	44
2) Orientation industrielle	46
a. Molécules issues de la dégradation du saccharose en lien avec la qualité industrielle.....	46
b. Procédé sucrier	48
Chapitre 2 : Changements physiologiques au cours du stockage.....	52
1) Matériels et méthodes	52
a. Échantillonnage	52
i. Silo conservation/variétés	52
ii. Silo conservation longue durée d'Origny (CLD d'Origny)	56
b. Analyses physiques	58
i. Développement de pourriture : indice et taux de pourriture	58
ii. Résistance physique.....	60
iii. Marc.....	60
iv. Fibres	61
v. Pectines	62
c. Analyses biochimiques	62

i.	Richesse (polarimètre)	62
ii.	Saccharose, hexoses, autres sucres et bétaine (HPLC)	64
iii.	Matière sèche	65
d.	Méthode statistique.....	65
i.	Nettoyage des données.....	66
ii.	Effet des facteurs et classes des niveaux de facteur	67
2)	Résultats et discussions	68
A.	Les changements physiques	68
a.	Développement de pourriture	68
i.	Essai conservation/variété.....	68
iii.	Essai CLD d'Origny	72
b.	Résistance physique.....	74
c.	Marc.....	77
d.	Fibres	79
e.	Pectines.....	85
❖	Conclusion sur les changements physiques au cours du stockage	89
B.	Les changements biochimiques.....	93
❖	Validation de la méthode HPLC	93
a.	Saccharose	95
i.	Essai conservation/variété.....	95
ii.	Essai CLD d'Origny	99
b.	Hexoses.....	102
i.	Essai conservation/variété.....	102
ii.	Essai CLD d'Origny	107
c.	Matière sèche.....	109
i.	Essai conservation/variété.....	109
ii.	Essai CLD d'Origny	112
d.	Bétaine.....	114
i.	Essai conservation/variété.....	114
ii.	Essai CLD d'Origny	116
e.	Raffinose.....	116
❖	Conclusion sur les changements biochimiques au cours du stockage	117
3)	Bilan des changements physiques et biochimiques au cours du stockage et perspectives	122
<u>Chapitre 3 : Indicateurs de contaminations des racines.....</u>		125
1)	Matériels et méthodes.....	126
a.	Essai CLD d'Origny et analyses HPLC.....	126
b.	Analyse des composés organiques volatils (COV).....	126
i.	Échantillonnage	126
ii.	Analyses GC-MS	127
iii.	Intégration des données	128
iv.	Réduction des données et analyse statistique.....	128

2) Résultats et discussions	129
a. Les hexoses	129
b. Un trisaccharide, indicateur de contaminations avancées	131
c. Les composés organiques volatils (COV)	135
i. Premiers tests et optimisation de la méthode d'analyse	135
ii. Au cours du stockage	137
iii. Comparaison entre les racines saines et malades	146
iv. Bilan des analyses de COV	150
3) Conclusion sur les indicateurs de contaminations des racines et perspectives	153
Chapitre 4 : Travaux initiés	156
1) Activités enzymatiques	156
a. Matériels et méthodes	156
i. Échantillonnage	156
ii. Analyses	157
b. Résultats	159
c. Conclusion et perspectives	159
2) Analyses microbiologiques	160
a. Matériels et méthodes	160
i. Échantillonnage	160
ii. Analyses	161
b. Résultats	162
i. Épiderme des racines	162
ii. Intérieur des racines	164
c. Conclusion et perspectives	165
3) Induction de mécanismes de défense chez la betterave sucrière	165
a. Matériels et méthodes	166
i. Caractéristiques des produits	166
ii. Échantillonnage	167
iii. Analyses	168
b. Résultats	168
c. Conclusion et perspectives	169
Discussion générale et lien avec le procédé industriel	172
Conclusion générale et perspectives de la thèse	177
Références bibliographiques	179

Liste des abréviations

- ACP : Analyse en Composantes Principales
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AgMRC : Agricultural Marketing Resource Center
- AInv : Invertases acides
- AMDIS : Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System
- ATP : Adénosine TriPhosphate
- BBRO : British Beet Research Organisation
- BDD : Base De Données
- BmJ : *Bacillus mycoides* isolate Bac J
- BNM : Betteraves Non Marchandes
- CaCl₂ : Chlorure de calcium
- CEE : Communauté Économique Européenne
- cf : confer
- CIPAN : Culture Intermédiaire Piège À Nitrates
- CLD : Conservation Longue Durée
- CLS : Cercospora Leaf Spot
- cm : centimètres
- COV : Composés Organiques Volatils
- CP : Composantes Principales
- DTT : DiThioThreitol
- ELSD : Détecteur à Diffusion de Lumière (« Evaporative Light Scattering Detector »)
- ETA : Entreprise de Travaux Agricoles
- ext : extérieur
- FEH : Fructane ExoHydrolase
- F6P : Fructose-6-Phosphate
- g : grammes
- GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse
- GPI : Glucose-6-Phosphate Isomérase
- G6P : Glucose-6-Phosphate
- ha : hectares
- HE : Huiles essentielles
- HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression (« High Pressure Liquid Chromatography »)
- HS SPME GC-MS : Head-Space Solid Phase MicroExtraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry
- IfZ : Institut für Zuckerrübenforschung
- Int : intérieur
- Inv : Invertases
- InvA : Invertases acides
- InvN : Invertases neutres

- IP : Indice de pourriture
- IRBAB : Institut Royal Belge pour l'Amélioration de la Betterave
- IRS : Instituut Voor Rationele Suikeproductie (ITB en Hollande)
- ITB : Institut Technique de la Betterave
- J0 : jour de récolte (zéro jour de stockage)
- MCP : Moindres Carrés Partiels
- MDH : Mannitol DésHydrogénase
- MEC : Matrice ExtraCellulaire
- M&M : Matériels et Méthodes
- μL : microlitre
- mM : millimolaire
- min : Minute(s)
- MS : Matière sèche
- MW : MégaWatt
- m/z : Rapport masse sur charge de la molécule
- ng : nanogramme (10^{-9})
- NaCl : Chlorure de sodium
- NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné
- NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné
- NIST : National Institute of Standards and Technology
- Nb : Nombre
- PAC : Politique Agricole Commune
- pb : paire de bases (nucléiques)
- PK : Pyruvate Kinase
- PLS : Partial Least Squares
- ppm : partie par million
- PVPP : PolyVinylPolyPyrrolidone
- q-PCR : quantitative-Polymerisase Chain Reaction
- Rép : Répétition biologique
- R&D : Recherche et Développement
- RSE : Responsabilité Sociale des Entreprises
- SBP : Sirop Basse Pureté
- SC : Sucre Cristal
- SPME : Micro-extraction sur Phase Solide
- SPS : Sucrose Phosphate Synthase
- SS : Sucrose Synthase
- S6P : Saccharose-6-Phosphate
- T°C : Température en degré Celsius
- UDP-G : Uridine DiPhosphate-Glucose
- USDA-ERS : United States Department of Agriculture – Economic Research Service

Lexique

- **Automotrice** : Machine agricole conçue pour la récolte des betteraves sucrières.
- **Collet** : Zone d'insertion des feuilles dans la racine - Délimitation entre le bouquet foliaire et la racine.
- **Cétoacide** : Acide organique portant les fonctions acide carboxylique et cétone. La voie des cétoacides est un ensemble de réactions impliquant des acides aminés, pour synthétiser des alcools notamment. Elle est localisée dans la mitochondrie de plusieurs microorganismes.
- **Cumul degré jours** : Unité de mesure du cumul des températures journalières à l'intérieur ou l'extérieur d'un tas de racines au cours du temps $\rightarrow T^{\circ}Cj_4 = T^{\circ}Cj_1 + T^{\circ}Cj_2 + T^{\circ}Cj_3$.
- **Décolletage** : Action de retirer le collet (bouquet foliaire) des racines de betteraves.
- **Dessalage** : Action de retirer les sels présents dans une solution (chlorures, sulfates, phosphates,...) pour éviter la dénaturation des protéines (enzymes).
- **Dextrogyre** : Molécule qui dévie la lumière vers la droite (pouvoir rotatoire).
- **°Brix** : Pourcentage de matière sèche soluble contenu dans les jus sucrés, mesuré par un réfractomètre.
- **Carbonatation** : Action d'ajouter du dioxyde de carbone dans le procédé sucrier pendant la phase d'épuration suite à un apport de chaux (formation de carbonate de calcium et élimination des impuretés).
- **Éléments mélassigènes** : éléments indésirables dans l'extraction du sucre blanc, entrant dans la composition de la mélasse. Ils résultent de la purification du jus extrait des racines et sont principalement des minéraux, les sucres invertis et la bétaine.
- **Hyphe** : Appareil végétatif des champignons sous forme de filaments, constituant le mycélium.
- **Mélasse** : Sirop de basse pureté (SBP) issu du raffinage du sucre, principalement composé de minéraux, bétaine et de sucres invertis, et utilisé pour la fermentation alcoolique.
- **Paroi pectocellulosique** : structure de protection enveloppant les cellules végétales. Elle est principalement constituée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines.
- **Rapport m/z** : rapport masse sur charge.
- **Recette du planteur** : Somme d'argent que perçoit le planteur suite à la récolte de son champ, dépendante de la richesse des racines et de la qualité de l'arrachage (tare déchets).
- **Résistance systémique** : Réaction de défense généralisée à l'organisme entier, visant à lutter contre un stress (contamination microbiologique principalement).
- **Richesse** : Concentration en saccharose des racines, mesurée au polarimètre et exprimée en pourcent.
- **Silo** : Terme employé pour désigner les tas de racines de betteraves sucrières confectionnés après la récolte.
- **Stress abiotique** : État physiologique d'alerte provoqué par un facteur environnemental, telle que la salinité ou la chaleur.
- **Stress biotique** : État physiologique d'alerte provoqué par un organisme vivant, tels que les microorganismes.
- **Unité** : Correspond à des kg/ha en terme de dosage.

- **Vernalisation** : Période de froid subie par la plante, permettant la transition de la phase végétative à la phase de reproduction (germination et floraison).
- **Vinasse** : Résidu de la fermentation alcoolique des SBP, concentré en minéraux, notamment en potassium, et bétaine, obtenu par distillation, et utilisé comme engrais.

Liste des figures

Figure n°1 : Transformations en lien avec la respiration des racines pendant le stockage [Koster and Jorritsma, 1980].	20
Figure n°2 : Pertes en sucre en fonction du cumul de degré jours. Résultats de vingt-deux essais de stockage de longue durée sur quatre variétés - 2010/2011 [Olsson, 2011].	22
Figure n°3 : Stockage traditionnel en silo au Royaume-Uni [BBRO, 2011].	24
Figure n°4 : Structure apparente d'une betterave sucrière [Decloux, 2002].	26
Figure n°5 : Structure interne de la racine de betterave sucrière [Adaptation de Draycott, 2006].	28
Figure n°6 : Conséquences d'un choc mécanique sur racine de betterave mature [Ibrahim et al., 2001].	29
Figure n°7 : Structure externe (MEC) des cellules végétales [Sigma-Aldrich].	30
Figure n°8 : Voies de transport du saccharose du phloème aux cellules de stockage [Adaptation de Wyse, 1979].	31
Figure n°9 : Transport du saccharose depuis sa synthèse dans une cellule du mésophylle (partie interne de la feuille, organe source) jusqu'aux cellules "puits" de la racine [Sauer, 2007].	31
Figure n°10 : Potentielles transformations subies par le saccharose dans la racine de betterave sucrière [Fieuw and Willenbrink, 1990].	32
Figure n°11 : Pertes en sucre en fonction du cumul des températures lors d'un stockage en silo [Tereos, 2015].	36
Figure n°12 : Moyens de protection mis en place contre le gel [Tereos, 2013].	37
Figure n°13 : Essai conservation en silo chaulé [Tereos, 2015].	38
Figure n°14 : Éléments de structure des arracheuses [Grimme, 2016].	39
Figure n°15 : Table à rouleaux pour le déterrage [Grimme, 2016].	39
Figure n°16 : Recommandations pour le scalpage des racines à la récolte [Tereos, 2015].	40
Figure n°17 : Effet des concentrations en K ⁺ sur le taux d'assimilation du saccharose dans la racine de betterave sucrière [Adaptation de Saftner and Wyse, 1980].	42
Figure n°18 : Maladies foliaires [Tereos, 2016].	44
Figure n°19 : Synthèse du raffinose [Nishizawa et al., 2008].	47
Figure n°20 : Synthèse du mannitol par <i>Leuconostoc</i> [Grobbe et al., 2001].	48
Figure n°21 : Procédé de transformation du sucre extrait des racines de betteraves [Decloux, 2002].	50
Figure n°22 : Vue du dessus d'un silo conservation/variété, avant recouvrement.	53
Figure n°23 : Vues en longueur et de face d'un silo conservation/variété.	53
Figure n°24 : Photos illustrant les différents indices de pourriture (essai conservation variétés 2016/2017).	59
Figure n°25 : Principe de fonctionnement d'un polarimètre [INSA Rouen, 2014].	62
Figure n°26 : Chaîne d'analyse multi-cassettes [Tereos, 2011].	63
Figure n°27 : Chromatogramme d'un échantillon de betterave en fin de stockage (HPLC-RI) [Tereos, 2017].	64
Figure n°28 : Résidus studentisés en fonction des valeurs prédites des mesures de matière sèche.	66
Figure n°29 : Droite de Henry après nettoyage des données "Pertes de matière sèche".	66
Figure n°30 : Évolution de l'indice de pourriture au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 1 – Arrachage mécanique.	68

Figure n°31 : Évolution de l'IP au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 2 - Arrachage mécanique.	69
Figure n°32 : Développement de pourriture au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 1.....	70
Figure n°33 : Développement de pourriture au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 2.....	70
Figure n°34 : Évolution du taux de pourriture au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD (Origny).....	73
Figure n°35 : Résistances physiques au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 1 - Stockage silo/arrachage mécanique.	74
Figure n°36 : Résistances physiques au cours du stockage - Essai conservation/variétés - Année 2 – Stockage silo/arrachage mécanique.	75
Figure n°37 : Corrélation entre l'IP de fin de stockage et la résistance physique à la récolte - Essai conservation/variétés - Année 1 – 5 variétés.....	76
Figure n°38 : Corrélation entre l'IP de fin de stockage et la résistance physique à la récolte - Essai conservation/variétés – Résultats pour les 3 variétés étudiées sur 2 ans.	77
Figure n°39 : Évolution du marc au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés – Résultats pour les 3 variétés sur les 2 années – Arrachage mécanique.	78
Figure n°40 : Teneurs en marc au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Regroupement des 3 variétés - Année 2.....	78
Figure n°41 : Concentrations en marc en fin de stockage par variété en fonction de l'arrachage – Essai conservation/variétés - Année 2.	79
Figure n°42 : Corrélation entre la résistance physique et la concentration en marc (fraction insoluble) le jour de la récolte - Essai conservation/variété année 2 (méthode IRS pour le marc).....	80
Figure n°43 : Concentrations en fibres totales par variété le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 1.	81
Figure n°44 : Concentrations en fibres totales par variété le jour de la récolte et en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.....	81
Figure n°45 : Gain en fibres en fin de stockage par variété en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 2.	82
Figure n°46 : Corrélation entre le marc et les fibres en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.	83
Figure n°47 : Concentrations en hémicellulose par variété le jour de la récolte - Essai conservation/variétés - Année 1.	84
Figure n°48 : Concentrations en hémicellulose par variété le jour de la récolte et en fin de stockage - Essai conservation/variétés - Année 2.....	84
Figure n°49 : Corrélation entre les résultats d'hémicellulose et de fibres – Essai conservation/variétés – Année 2.	85
Figure n°50 : Corrélation entre les résultats d'hémicellulose et de marc en fin de stockage – Essai conservation/variétés – Année 2.....	86
Figure n°51 : Concentrations en pectines par variété et par lieu le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 1.	87
Figure n°52 : Concentrations en pectines par variété le jour de la récolte et en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.	87
Figure n°53 : Corrélation entre le marc et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.	88

Figure n°54 : Corrélation entre la résistance physique et les pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.	89
Figure n°55 : Corrélation entre le développement de pourriture de fin de stockage et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.	89
Figure n°56 : Corrélation entre les résultats des mesures de richesse par polarimétrie et par HPLC en fonction de l'indice de pourriture.	94
Figure n°57 : Corrélation entre les résultats des mesures de glucose par colorimétrie et par HPLC en fonction de l'indice de pourriture.	95
Figure n°58 : Évolution de la concentration en saccharose (richesse) en fonction de la variété – Essai conservation/variétés - Année 1 (polarimétrie) – 2 sites – Arrachage mécanique.	96
Figure n°59 : Pertes en sucre par variété en fin de stockage – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 1.	96
Figure n°60 : Pertes en saccharose au cours du stockage – Essai conservation/variétés - Année 1 (polarimétrie).	97
Figure n°61 : Évolution des concentrations en saccharose au cours du stockage par variété en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Année 2 (HPLC).	98
Figure n°62 : Pertes en saccharose à 500°j int en fonction du lieu, de l'arrachage et de l'année – Essai conservation/variétés des 2 années.	99
Figure n°63 : Évolution des concentrations en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Résultats de l'essai CLD d'Origny.	100
Figure n°64 : Évolution des pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Résultats de l'essai CLD d'Origny.	101
Figure n°65 : Corrélation entre le développement de pourriture et les pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage – Essai CLD d'Origny - De 212°j int à 406°j int.	102
Figure n°66 : Évolution des concentrations en glucose au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés - Année 1 – Arrachage mécanique - Méthode colorimétrique.	103
Figure n°67 : Concentration en glucose en fin de stockage en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 1/Méthode colorimétrique.	104
Figure n°68 : Évolution des hexoses au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 2.	105
Figure n°69 : Évolution des concentrations en glucose au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés - Année 2 – Arrachage mécanique (Regroupement des 2 lieux).	106
Figure n°70 : Évolution de la concentration en hexoses au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.	107
Figure n°71 : Évolution des concentrations de glucose et de fructose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD Origny.	108
Figure n°72 : CLD d'Origny – Corrélation entre la production d'hexoses et les pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage – Essai CLD d'Origny – De 212°j int à 406°j int.	109
Figure n°73 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage par variété – Essai conservation/variétés - Année 1 – Deux sites – Arrachage mécanique.	110
Figure n°74 : Pertes de matière sèche au cours du stockage – Essai conservation/variétés - Année 1 – Deux sites - Moyenne des pertes par variété.	110
Figure n°75 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage en fonction de la variété – Essai conservation/variétés - Année 2.	111
Figure n°76 : Pertes de matière sèche au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Année 2.	112

Figure n°77 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.....	113
Figure n°78 : Pertes de MS au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.....	113
Figure n°79 : Corrélacion entre les pertes de MS et de saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny.....	114
Figure n°80 : Évolution des teneurs en bétanine au cours du stockage par variété - Essai conservation/variedades - Année 2 – Deux types d'arrachages confondus.....	115
Figure n°81 : Évolution de la concentration en bétanine au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.....	116
Figure n°82 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage – Essai conservation/variedades - Année 2 – Arrachage manuel – Site d'Origny.....	120
Figure n°83 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai conservation/variedades - Année 2 - Arrachage mécanique classique – 2 sites.....	120
Figure n°84 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage classique.....	120
Figure n°85 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.....	121
Figure n°86 : Photos des racines saines (à gauche) et malades (à droite) utilisées pour l'analyse des COV – Sortie de la laveuse de l'atelier agronomique.....	127
Figure n°87 : Corrélacion entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.....	129
Figure n°88 : Corrélacion entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage - Projet conservation/variedad (année 2) – Arrachage mécanique – Origny.....	130
Figure n°89 : Extrait du chromatogramme des standards de kestose et raffinose.....	131
Figure n°90 : Concentrations de la molécule détectée au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.....	132
Figure n°91 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.....	133
Figure n°92 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage classique.....	133
Figure n°93 : Corrélacion entre la concentration en « kestose » et le taux de pourriture - Essai CLD d'Origny.....	134
Figure n°94 : Corrélacion entre la concentration en « kestose » et autres molécules et la perte en saccharose - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.....	135
Figure n°95 : Quantité totale de COV en fonction de la durée de stockage – Moyenne sur les deux années (en excluant le prélèvement à 250°j int de l'année 1).....	138
Figure n°96 : Analyse des COV dans le temps – Représentation en « score plots » des échantillons selon les deux composantes principales (résultat de l'ACP).....	139
Figure n°97 : COV majoritaires du stockage des racines – Essai conservation/variedades année 2 – Regroupement des résultats de V1 et V2.....	140
Figure n°98 : COV spécifiques de la fin de stockage (500°j int) – Essai conservation variedades (année 2) – Moyenne des 2 variedades.....	141
Figure n°99 : Analyse des COV dans le temps – Résultats de la méthode PLS – Représentation en « score plots » des échantillons selon les deux facteurs principaux.....	143
Figure n°100 : Résultats de l'ACP des COV par variété au cours du stockage – Représentation en « score plots » des échantillons en fonction des deux CP - Année 2.....	144

Figure n°101 : COV majoritaires en fin de stockage en fonction de la variété – Année 2. Les barres d'erreur représentent les écarts-types des mesures.....	145
Figure n°102 : Racines saines et malades – Quantité totale de COV détectée en fonction de l'état sanitaire des racines (moyenne sur les deux années).....	146
Figure n°103 : COV majoritaires caractéristiques des racines malades (année 2).	147
Figure n°104 : COV majoritaires des racines saines et malades – Année 2.....	147
Figure n°105 : Représentation en « score plots » des résultats de l'ACP des échantillons sains et malades selon les deux composantes principales – Année 2.....	148
Figure n°106 : Représentation en « score plots » des résultats de la méthode PLS des échantillons sains et malades selon les deux facteurs principaux – Année 2.	149
Figure n°107 : Corrélation entre l'acétate d'éthyle et l'IP en fonction de la variété – Essai conservation/variétés (année 2).	151
Figure n°108 : Corrélation entre le benzaldéhyde et l'IP – Essai conservation/variétés (année 2).	151
Figure n°109 : COV principaux présents au cours du stockage en lien avec l'évolution de l'indice de pourriture (IP) – Année 2 - Regroupement des deux variétés.	152
Figure n°110 : Corrélation entre l'hexanal et l'IP – Essai conservation/variétés (année 2).....	152
Figure n°111 : Activité de l'InvN chez la feuille et la racine de betterave	159
Figure n°112 : Moyenne de la population bactérienne au cours du stockage sur l'épiderme des racines – Projet conservation/variété (année 1) – Site de Lillers – Arrachage mécanique.....	162
Figure n°113 : Moyenne de la population bactérienne en fin de stockage sur l'épiderme des racines en fonction de l'arrachage – Projet conservation/variété (année 1) – Site de Lillers.....	163
Figure n°114 : Moyenne de la population bactérienne en fin de stockage au cœur des racines en fonction de l'arrachage – Projet conservation/variété (année 1) – Site de Lillers.....	164
Figure n°115 : Taux de pourriture en fonction du traitement en fin de stockage (environ 575°j int) .	168
Figure n°116 : Interactions entre BmJ et la betterave sucrière - Stress oxydatif et induction des protéines de défense [Bargabus et al., 2002].....	170

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Comparatif des différents types de stockage en Europe	25
Tableau n°2 : Exemples de systèmes de rotation de culture.....	41
Tableau n°3: Répartition des analyses avec les partenaires du projet	55
Tableau n°4 : Caractéristiques variétales	56
Tableau n°5 : Correspondance entre les semaines de sorties des sacs et les cumuls de température atteints à chaque sortie	57
Tableaux n°6 : Échelles d'évaluation des IP.....	58

Introduction

Source d'énergie, réconfort pour les gourmands ou encore conservateur naturel, le sucre est une denrée alimentaire indispensable, utilisé dans de nombreux aliments et boissons. En Europe, 40 kg de sucre par an par personne sont consommés [Licht, 2004]. Au cours de ces 60 dernières années, la consommation de sucre dans le monde a été multipliée par cinq.

Le sucre, ou plus exactement, le saccharose, est produit par la betterave sucrière ou la canne à sucre.

La culture de la betterave sucrière est répandue en Europe, Asie, Afrique et Amérique du Nord. En France, elle représente environ 400 000 ha répartis dans le Nord et le Nord-Est, en Normandie, en Ile de France et dans la région Centre. Avec un rendement moyen de 85 t/ha (soit 12,2 t/ha de sucre), les racines de betteraves alimentent les industries sucrières [Le Figaro, 2016].

Tereos est une coopérative agricole présente sur les marchés du sucre, de l'amidonnerie, de l'alcool, du bioéthanol, de la nutrition animale et des protéines végétales. Présente dans seize pays, dont notamment la République tchèque, la Roumanie, le Brésil, le Mozambique, la Tanzanie et le Kenya, la coopérative regroupe 24 000 collaborateurs. En France, Tereos possède neuf sites industriels basés, du Nord au Sud, à Lillers, Attin, Boiry, Escaudoeuvres, Origny-Sainte-Benoîte, Bucy-le-Long, Chevières, Connantre-Morains et Artenay.

Troisième groupe sucrier mondial, leader en France, Tereos commercialise son sucre sous les marques Béghin SAY, La Perruche, Blonvilliers, Ligne Sucre et Stévia. Au Brésil, sous la marque Guarani ; TTD en République tchèque, Bourbon à l'île de la Réunion, et Whitworths en Angleterre.

Les industries alimentaires sont les principales clientes de la production sucrière, notamment Coca Cola, Kellogg's, Cointreau, Danone, Madeleines BIJOU, et bien d'autres. Il s'agit des sucres industriels cristallisés, et aussi des sucres haute filtrabilité pour le secteur des boissons. Le groupe propose des sirops (standards, de sucres invertis et des mélanges), destinés également aux industries pharmaceutiques telles qu'Almirall, Entrance, Ernes et autres. Sans oublier les grandes surfaces pour le « sucre de bouche », destiné aux particuliers.

En 2006, le marché du sucre a fait l'objet d'une nouvelle réforme.

À partir du 1^{er} octobre 2017, les quotas de production sont supprimés. Il n'y a plus de limite de productions et d'exportations, et le prix minimum garanti aux producteurs n'existe plus.

Pour faire face à cette évolution, Tereos a choisi d'adopter la stratégie des longues campagnes de production. En allongeant la durée de fonctionnement de ses usines, le groupe réduit ses coûts industriels, augmente sa productivité et conserve sa compétitivité.

Récoltées entre mi-septembre et fin novembre, les racines sont empilées en silos à l'extrémité du champ, et y restent stockées jusqu'à leur enlèvement par des camions pour approvisionner l'usine (de quelques jours à un mois de stockage). Les unités de production étant déjà à leur capacité maximale, si la production agricole augmente, alors que la cadence industrielle reste la même, les silos resteront stockés en champ plus longtemps (jusqu'à plus de 2 mois). Les

longues campagnes se traduisent donc par l'allongement de la durée de stockage des racines de betteraves.

Pour la campagne 2017/2018, une hausse des volumes de betteraves transformées en usine de 30 % est prévue (20 millions de tonnes) ; avec une durée de campagne en usine prolongée d'environ 20 jours (140 jours au total).

Les racines sont des organismes végétaux. Elles respirent et consomment leur énergie pour maintenir leur métabolisme. Plus elles seront stockées longtemps, plus elles consommeront leurs réserves en sucre, et plus les pertes industrielles seront importantes.

L'objet de la thèse est tout d'abord de comprendre les mécanismes de transformation du saccharose au cours du stockage : en quoi le saccharose est-il transformé ? Par quels mécanismes physiologiques ? Quels sont les facteurs qui influencent cette transformation ? Quelles sont les pertes engendrées ?

Ensuite, l'idée est d'identifier des pistes d'action afin de limiter les pertes au cours du stockage et de garantir la qualité industrielle des racines.

Le projet de thèse a été mené selon deux approches complémentaires. D'une part, une approche agronomique, abordée dans ce mémoire ; d'autre part, une approche procédé industriel, abordée par Ciara Meade, dans un second mémoire. L'objectif est de mesurer l'impact de l'allongement des campagnes sur la physiologie des racines, et, en parallèle, sur leur qualité industrielle pour anticiper et maîtriser les éventuelles complications du procédé.

Le projet a évolué en coordonnant les analyses agronomiques et les analyses industrielles, afin d'axer le travail sur les éléments clefs de la conservation des betteraves. Le déroulement du projet s'est organisé autour d'un partenariat entre l'entreprise demandeuse : Tereos France, et deux laboratoires de recherche : l'ISA de Lille (établissement d'Yncréa Hauts de France), pour le volet agronomique ; et l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), pour le volet procédé.

J'étais en charge de la bonne conduite des différents essais agronomiques, et notamment la responsable projet de l'essai conservation/variétés, présenté plus loin dans le chapitre 2. J'étais également responsable de la collaboration avec différents laboratoires, et en charge de la collecte et du traitement des données issues des différentes analyses.

J'ai réalisé l'échantillonnage sur les différents essais, et j'ai conduit les analyses chromatographiques, accompagnée des techniciennes des laboratoires.

Ce mémoire s'ouvre sur une synthèse bibliographique des différents articles, livres et autres sources d'information disponibles sur la conservation de la racine de betterave.

Le chapitre 2 répond à la première problématique de la thèse qui consistait à étudier les changements physiologiques des racines au cours du stockage et à évaluer l'impact de différents facteurs sur la qualité industrielle des racines.

Le chapitre 3 aborde les nouvelles pistes à envisager pour détecter et réduire les dégradations en silo.

Le dernier chapitre fait état des projets complémentaires initiés dans le cadre de la thèse et qu'il semble pertinent de poursuivre.

Le mémoire se referme sur un chapitre soulignant le lien entre la qualité agronomique des racines et la qualité industrielle des jus extraits. Pour finir sur une conclusion générale et les perspectives qui s'offrent à l'entreprise à l'issue de cette thèse.

Un second document a été créé pour regrouper les annexes qui accompagnent ce mémoire.

Chapitre 1 : Cadre de l'étude

Qu'est-ce qui est connu et a été étudié dans le domaine de la conservation de la betterave sucrière ? Que connaît-on de la physiologie et du métabolisme de la racine ? Quels sont les facteurs qui influencent les pertes en sucre ?

Les scientifiques allemands, américains, anglais, belges, français, hollandais, et italiens, principalement, se sont intéressés à ces questions. La recherche bibliographique a permis d'orienter la thèse et de compléter les connaissances en interne en matière de physiologie et métabolisme de la betterave sucrière.

En interne, le groupe dispose d'un service agronomique déjà impliqué dans la conservation des racines. Des essais sont mis en place depuis 2003 dans le but d'identifier les facteurs qui influencent la conservation et de limiter les pertes en sucre pendant le stockage. Les informations issues de ces essais sont communiquées aux planteurs sous forme de lettres mensuelles d'information agronomique (Agroinfos). Ces lettres les informent des éléments à prendre en compte pour optimiser la conservation de leurs racines ; et les conseillent dans la gestion de leurs silos (logistique et protections).

La thèse a pour objectif de compléter ces essais, en comprenant et expliquant les pertes en sucre, et en faisant le lien entre la qualité agronomique des racines et leur qualité industrielle.

1) État de l'art

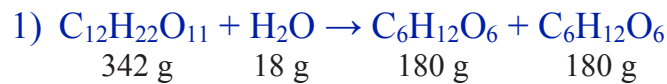
a. Origines des pertes en sucre au cours du stockage des racines de betteraves sucrières

Les pertes en saccharose sont principalement dues à la respiration [Kenter and Hoffmann, 2009]. Elles représentent 70 % à 80 % des pertes pendant le stockage [Wyse, 1970].

La respiration permet de fournir l'énergie nécessaire à la survie des racines au cours du stockage [Akeson and Stout, 1978]. Cette énergie pallie notamment le stress des racines engendré par leur nouvel environnement (champ → silo), la cicatrisation des blessures (décolletage et coups de disques dus à l'arrachage), la lutte contre les contaminations microbiologiques, et la production de repousses si le scalpage est sous-estimé.

Pour ce faire, le saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) est clivé en hexoses : glucose et fructose ($C_6H_{12}O_6$), afin d'approvisionner la chaîne respiratoire (équation 1). En réagissant avec l'oxygène, du dioxyde de carbone est produit ainsi que de l'eau. En parallèle, de la chaleur est produite et de l'énergie est stockée sous forme d'ATP (voir l'équation 2).

Équations :



[A.Philip Draycott, 2006]

Par leur déamination, les acides aminés peuvent également contribuer à la respiration (voir la figure n°1).

En cas de condition d'anaérobie, de l'éthanol est formé par fermentation. Les pertes en sucre sont alors plus élevées, à raison de l'utilisation de 15 à 16 fois plus de saccharose pour générer la même quantité d'ATP qu'en condition d'aérobie [Zhang and Greenway, 1994].

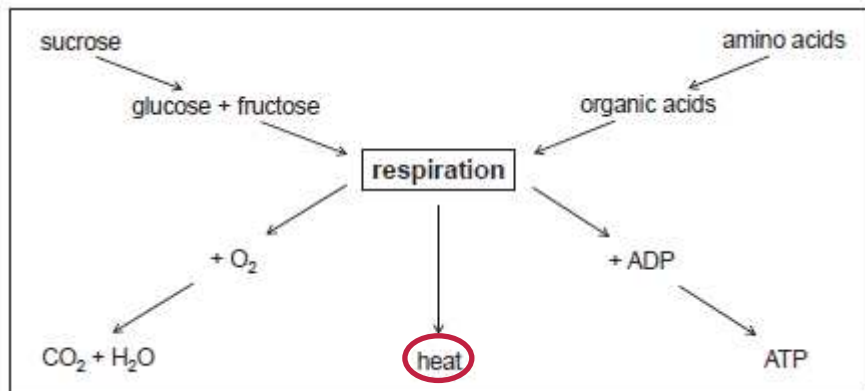


Figure n°1 : Transformations en lien avec la respiration des racines pendant le stockage
[Koster and Jorritsma, 1980].

La cicatrisation, les repousses et la pourriture sont les trois autres principaux phénomènes néfastes à la conservation. Les 24 heures suivant la récolte sont caractérisées par un fort taux de respiration, qui décline au cours des deux semaines suivantes, avec la cicatrisation des blessures [Ibrahim et al., 2001]. Des bourgeons au niveau du collet avec une forte activité métabolique contribuent à l'augmentation du taux de respiration [Steensen and Augustinussen, 2003 ; Hoffmann, 2012]. Et les bactéries et champignons, se développant pendant le stockage, consomment le saccharose pour leur propre survie [Jacobsen, 2006].

La chaleur et l'humidité sont des conditions optimales pour le développement des microorganismes. L'évacuation de la chaleur libérée par la respiration et le renouvellement de l'air pour éviter la fermentation permettraient de maintenir une ambiance saine dans le silo [Draycott, 2006 ; Hansen, 1950]. Un silo aéré serait adapté au stockage de longue durée pour limiter les pertes en sucre [Martens and Oldfield, 1970].

Bien que l'itinéraire cultural et le choix de la variété conditionnent la qualité des racines avant la récolte, les conditions de stockage jouent un rôle essentiel dans la conservation des racines.

En effet, même avec une richesse initiale satisfaisante, une dose d'azote optimale, des traitements fongicides adaptés, et un apport en eau raisonné, la qualité industrielle initiale des racines ne sera pas conservée si l'arrachage est effectué en conditions difficiles, avec des réglages agressifs, et si les racines sont stockées en conditions inadaptées.

La qualité du sucre est calculée en fonction de la richesse et des éléments mélassigènes, impactant le pH et la couleur du jus extrait [Huijbregts, 2003 ; Ruiz-Holst et al, 2003 ; voir l'équation 3].

$$3) Z_B = Pol - [0,19 (K + Na) + 0,274\alpha - N + 1,145I + 0,576]$$

Où :

Z_B : Concentration en saccharose corrigée (%)

Pol : Concentration en saccharose estimée par polarisation (%)

K : Concentration en potassium (mmoles/100g de râpure)

Na : Concentration en sodium (mmoles/100g de râpure)

N : Concentration en acides aminés (mmoles/100g de râpure)

I : Concentration en sucres invertis (g/100g de râpure)

Plusieurs facteurs sont donc à prendre en compte pour limiter les pertes en sucre pendant le stockage :

1. La durée de stockage (en lien avec la température de stockage)
2. L'agressivité de l'arrachage
3. Les conditions climatiques
4. Les pathogènes du sol
5. La variété

L'objectif pour un stockage de longue durée est d'avoir des racines propres et sèches, avec des blessures peu profondes et superficielles. De cette façon, les échanges gazeux sont facilités, le silo est aéré, et les contaminations sont réduites car les portes d'entrée aux pathogènes sont limitées.

Une température de stockage située entre 1,5°C et 5°C serait optimale [Oldfield et al., 1971a]. Au cours du stockage, le silo cumule les températures journalières. Plus un silo est stocké longtemps, plus son cumul de température est élevé. C'est le cumul de degrés jours qui est utilisé pour estimer la durée de stockage d'un silo (voir l'équation 4). À partir d'un cumul de 250°j extérieurs (cumul des températures à l'extérieur du silo, enregistrées à l'aide de sondes placées sur le silo) ou environ 350°j intérieurs (enregistrées en positionnant des sondes au cœur des silos ; voir l'annexe n°1 dans le second document accompagnant ce mémoire), les pertes en sucre augmentent de façon exponentielle [Olsson, 2011 ; voir la figure n°2].

$$4) \text{Cumul de degré jours} = \sum_{i=0}^n \left(\frac{T^{\circ max,i} + T^{\circ min,i}}{2} \right)$$

Où :

- i : récolte
- n : nombre de jour de stockage
- $T^{\circ max}$: température journalière maximale
- $T^{\circ min}$: température journalière minimale

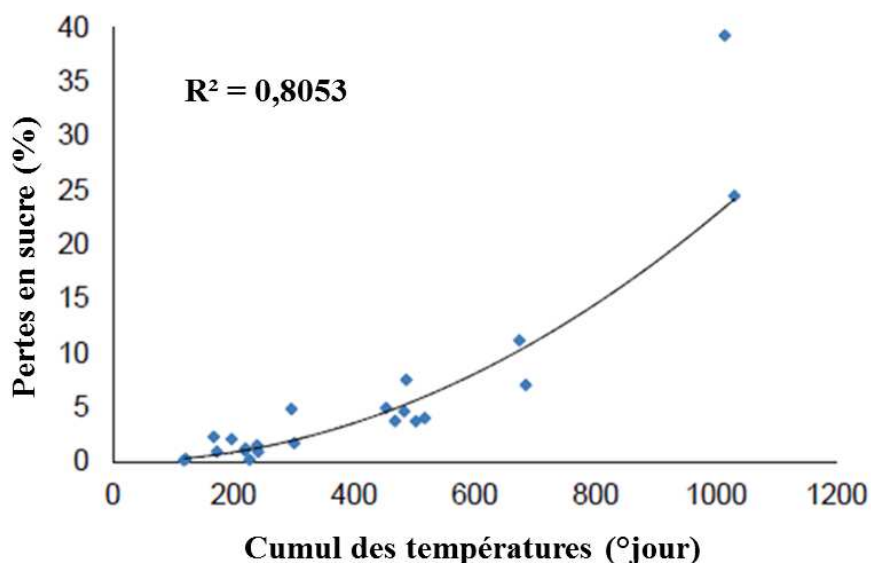


Figure n°2 : Pertes en sucre en fonction du cumul de degré jours. Résultats de vingt-deux essais de stockage de longue durée sur quatre variétés - 2010/2011 [Olsson, 2011].

Les industries sucrières sont à la recherche de solutions afin d’améliorer l’ambiance des silos et de limiter les pertes en sucre. En fonction de leur localisation géographique, les industries gèrent leur approvisionnement et leur stock en fonction des conditions météorologiques de leur région. Différentes logistiques sont ainsi mises en place dans les champs et dans les usines, et différents moyens de protection des silos également, principalement en fonction des conditions climatiques.

b. Conservation des racines à travers le monde

Il est intéressant de savoir ce qui est mis en place à travers le monde pour réduire les pertes en sucre au cours du stockage. Différents climats caractérisent chaque pays, et les industries sucrières ont adopté des dispositifs adaptés à leur région.

i. Amérique

Aux États-Unis, la betterave sucrière est cultivée dans trois régions principales qui regroupent 11 états : les grandes plaines (Colorado, Montana, Nebraska et Wyoming), le Nord du Midwest (Michigan, Minnesota et Dakota du Nord) et l’extrême ouest (Californie, Idaho, Oregon et l’état de Washington). Les régions les plus dynamiques en matière de production sont proches de la vallée de la rivière rouge (The Red River Valley), de l’ouest du Minnesota, et à l’est du Dakota du Nord. Une seconde zone de production conséquente se situe dans le Michigan, ensuite la région des grandes plaines, et finalement la région de l’extrême ouest [USDA ERS, 2017].

La Californie est une région unique en terme de production de betteraves sucrières, principalement dû aux fortes températures caractéristiques de la région, et aux récoltes planifiées pour répondre aux besoins des industries avoisinantes [AgMRC, 2012].

La récolte des betteraves dans la plupart des autres régions d'Amérique est courte (de deux à quatre semaines, à la fin de l'automne). Les racines sont stockées en extérieur en silos de 5 à 8 m de haut, 55 à 70 m de large et jusqu'à 400 m de long. Au début de la récolte (première semaine de septembre), les racines sont travaillées immédiatement, et ne passent donc pas par une période de stockage (Michigan sugarbeet, Research & Education Advisory Council, 2013). Le stockage permanent des racines en Amérique ne se produit que lorsque les températures sont favorables ($T^{\circ}\text{C} < 12^{\circ}\text{C}$) et qu'aucune maladie n'est détectée. En cas de chaleur, la capacité au stockage est réduite significativement en raison de l'augmentation du taux de respiration, de l'activité microbienne et des repousses.

Les campagnes s'étendent à 120 jours dans les zones aux hivers modérés, jusqu'à 250 jours dans la plupart des régions du Nord où les hivers longs et froids permettent le stockage de racines congelées à partir d'octobre jusqu'au printemps suivant (mi-mai) [American Sugar Crystal, 2005].

Des systèmes de ventilation, d'aération ou encore, des bâtiments équipés de systèmes de contrôle des températures sont également utilisés dans certaines régions afin de maintenir de basses températures ($T^{\circ}\text{C} < - 3^{\circ}\text{C}$) et permettre à l'air de circuler. Les pertes en sucre débutent dès les premiers jours de stockage, et si des conditions non-optimales sont appliquées, jusqu'à 50 % des pertes totales après récolte peuvent être comptabilisées dans les deux premières semaines de stockage. Il apparaît donc essentiel de disposer de conditions de stockage optimales.

ii. Canada

De nos jours, toutes les betteraves sucrières du Canada sont cultivées en Alberta (15 703 ha), avec une faible proportion cultivée en Ontario pour l'export en Amérique (3 785 ha) [Morrison, 2006]. Les conditions climatiques peuvent varier considérablement, donc aucune récolte ne se ressemble.

Les contraintes industrielles du Canada imposent que les cultures soient stockées dans une cour centrale pour une partie de l'hiver (représentant 120 jours). Ainsi, la campagne débute généralement à la fin de l'automne (septembre) et se termine au début du printemps (février). La récolte a lieu de septembre à début novembre [Morrison, 2006]. Les tas de racines extérieurs mesurent environ 5,5 m de haut, 60 m de large et 305 m de long.

iii. Royaume-Uni

En début de campagne, le stockage est minimal en raison de températures fluctuantes (conditions de conservation non-optimales). La méthode du « juste à temps » fonctionne particulièrement bien au Royaume-Uni. En effet, environ 10 % des racines ne sont pas récoltées pendant l'hiver (elles restent dans le sol jusqu'à leur transformation en usine), et un

gain de 40 % dans la teneur en saccharose peut être mesuré [British Beet Research Organisation (BBRO), 2011]

Comme aux États-Unis, le stockage de courte durée est quasiment inexistant au Royaume-Uni. La plupart des silos sont construits en zones ouvertes pour permettre la ventilation et le refroidissement, et sur des surfaces dures pour faciliter l'évacuation de l'eau.

Deux types de stockage sont identifiés. Un premier pour le début de campagne (stockage < 5 jours) : 2 m de haut maximum en couvrant une surface maximale de façon à faciliter la circulation de l'air et donc le refroidissement du tas. Et un second pour la fin de campagne : 2,5 m de haut maximum avec une surface réduite de façon à réduire les zones de gel.

Traditionnellement, ces silos offrent $1,5 \text{ m}^3/\text{T}$ de betteraves (soit $1 \text{ m}^3/0,7 \text{ T}$), et dessinent une zone de chargement d'environ 100 m^3 . De ce fait, ces silos sont d'environ 8 à 10 m de large, 2,5 m de haut maximum, de longueur variable, et avec une « forme en A » (« A-shaped » ; voir la figure n°3, à droite). Les hivers au Royaume-Uni ne sont pas assez longs et froids pour permettre un gel total des racines. C'est pourquoi les silos sont entourés de ballots de paille pour lutter contre les températures négatives (voir la figure n°3, à gauche).

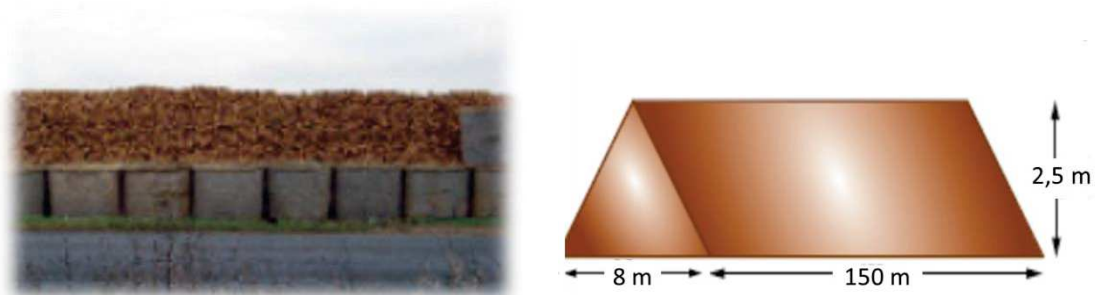


Figure n°3 : Stockage traditionnel en silo au Royaume-Uni [BBRO, 2011].

iv. Europe

Les régions principales de culture de la betterave sucrière sont l'Allemagne (515 000 ha), la France (461 000 ha), la Pologne (453 000 ha), les Pays-Bas (117 000 ha), l'Italie (273 000 ha), l'Espagne (157 000 ha), la République Tchèque (104 000 ha), la Belgique (98 000 ha), et le Danemark (70 000 ha) [Eurostat, 1996].

Ces pays s'impliquent dans la recherche scientifique pour approfondir les connaissances sur la betterave sucrière, et notamment sur le stockage de celle-ci. L'Institut International pour la Recherche sur la Betterave (IIRB) est une organisation non-gouvernementale qui promotionne la coopération internationale entre spécialistes de différents pays. Cet organisme publie fréquemment des mises à jour et conseils pour le stockage en Europe. Un séminaire sur le stockage de longue durée a eu lieu en Allemagne pour comparer les différentes méthodes et organisations des chantiers de betteraves dans différents pays [Legrand and Wauters, 2013 ; voir le tableau n°1].

À la différence des États-Unis, l'hiver en Europe n'est pas rude de façon permanente, et le risque d'enchaîner des cycles gel/dégel est important. Ceux-ci altèrent l'intégrité des cellules

et engendrent des problèmes au niveau du procédé industriel. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des moyens de protection efficaces contre le gel. En plus de l'expérience en interne des industries sucrières, des organismes de recherche en Europe proposent de la documentation à ce sujet : ITB (France), IRBAB (Belgique), IRS (Pays-Bas), IfZ (Allemagne).

Pays	Forme du silo	Moyens techniques	Forme spéciale pour la fin de campagne	Largeur du silo	Moyens de protection contre le gel	Protections contre les fortes périodes de froid
France	Triangulaire Trapézoïdale	Automotrice Intégrale	Non	8-10 m 16 m	Paille hachées (5 cm) après refroidissement Bâche géotextile	
Belgique	Triangulaire	Intégrale	Non	9,5 m	Bâche géotextile	Bâches noires perforées
Pays-Bas	Triangulaire/ Rectangulaire	Automotrice	Non	8-20 m (fonction de la surface disponible)	Toile polaire après refroidissement	Bâches en plastique coupe-vent
Allemagne	Triangulaire	Intégrale	Non	7 – 9,5 m	Bâche géotextile	Bâches géotextiles et en plastique
Danemark	Triangulaire	Automotrice Intégrale	Plus large : trapézoïdale ou rectangulaire	10-12 m (davantage pour les formes rectangulaires)	Bâches géotextile et en plastique	Paille Bâches géotextile et en plastique
Suisse	Triangulaire	Automotrice	Non	Pas de spécifications	Bâche géotextile Paille hachée	Bâche géotextiles et en plastique

Tableau n°1 : Comparatif des différents types de stockage en Europe [Legrand and Wauters, 2013].

En adoptant la stratégie des longues campagnes, Tereos vise une activité industrielle de 140 jours (de mi-septembre à début février). Pour les premiers arrachages de septembre à octobre, la durée de stockage des racines est minimale, et les pertes en sucre limitées. En effet, les usines travaillent de 7000 T à 23 000 T de betteraves par jour, ce qui crée un flux continu de matières premières au lancement de la campagne. La cour de stockage qui approvisionne l'usine est vide ; de ce fait, aussitôt arrachées, les racines sont alors transportées jusqu'au site industriel.

Les essais internes Tereos mesurent des pertes en sucre obligatoires d'environ 2 % pendant les deux premières semaines de stockage. Il s'agit de l'énergie dépensée par la racine pour cicatriser de ses blessures d'arrachage et pour s'adapter à son nouvel environnement « hors-sol ».

En fin de campagne, les silos peuvent rester stockés en bout de champ pendant 2 mois. En fonction de la qualité d'arrachage et de l'état sanitaire des racines, les pertes en sucre peuvent atteindre 70 % après 40 jours de stockage [Wyse, 1978a].

En moyenne, un silo perd entre 100 et 200 g de sucre par jour par tonne de racines [Draycott, p. 387, 2006]. Avec pour objectif l'allongement des campagnes, le but est ici de limiter au maximum les pertes en sucre au cours du stockage.

La racine de betterave sucrière, *Beta vulgaris*, appartient à la famille des Chénopodiacées, famille de plantes dicotylédones. C'est une plante bisannuelle. La première année est caractérisée par une phase végétative avec le développement de la surface foliaire, de la racine, et le stockage de saccharose. La seconde année, suivant une période de vernalisation, est la phase de reproduction, où la plante va puiser dans ses réserves de sucre pour confectionner sa hampe florale.

La récolte de la betterave sucrière a donc lieu à la fin de la première année (entre mi-septembre et jusqu'à fin novembre).

c. Facteurs physiologiques

i. Structure des racines

La racine de betterave sucrière est un organe de réserve de forme conique, blanc et de taille variable (15 à 35 cm). Il est parcouru par deux sillons saccharifères et peut peser de 800 g à 4 kg. Le saccharose s'y accumule après avoir été élaboré dans les feuilles. Il représente de 14 à 21 % du poids de la racine [CEDUS, 2012]. Le bouquet foliaire assure la photosynthèse et est délimité de la racine par le collet. La racine principale se termine par un pivot qui assure la stabilité verticale de la plante. Des radicelles, racines secondaires, assurent l'absorption de l'eau et des sels minéraux grâce aux poils absorbants (voir la figure n°4).

Une racine est composée à 75 % d'eau, le restant constitue la matière sèche. Cette dernière regroupe le saccharose (environ 17 %), le marc (fraction insoluble, environ 5 %) et le reste des éléments solubles, tels que les matières azotées, les sels minéraux, les sucres (glucose, fructose,...) et les acides organiques (environ 3 % ; voir l'annexe n°2) [CEDUS, 2012].

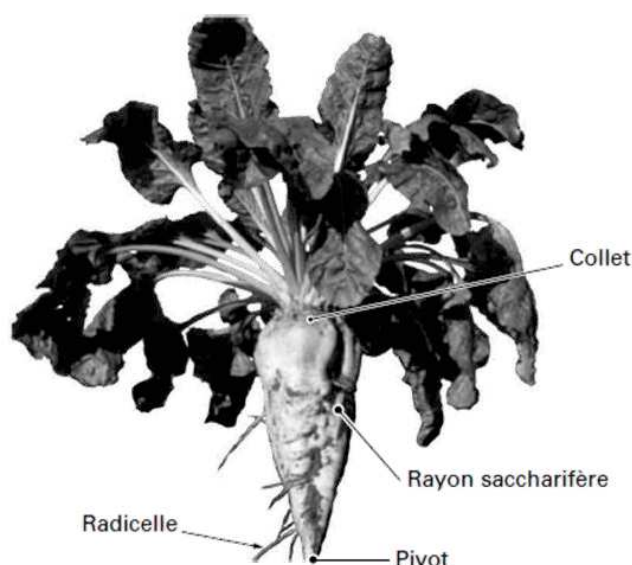


Figure n°4 : Structure apparente d'une betterave sucrière [Decloux, 2002].

En interne, une croissance secondaire a lieu grâce à la formation de plusieurs couches successives de cambium (de 6 à 7 cercles de cambium en moyenne). L'épaississement de la racine débute environ un mois et demi après le semis (début mai), avec la formation de l'ensemble des cercles de cambium ; et se termine mi-août, avec des divisions cellulaires et l'élargissement des cellules [Artschwager, 1926 ; Doney et al., 1981 ; Metzner et al., 2014]. Le cambium est une fine couche de cellules indifférenciées à l'origine de la production de xylème et de phloème (voir la figure n°5). Ces derniers sont les tissus respectivement conducteurs de la sève brute (eau, ions) et de la sève élaborée (assimilats).

À proximité du phloème, des cellules de stockage viennent compléter cette organisation transversale. Il s'agit de parenchymes, cellules peu différenciées. Lorsque le saccharose est acheminé jusqu'à la racine via le phloème, il est transporté jusqu'aux parenchymes pour y être stocké. La quantité de saccharose emmagasinée dans la racine serait liée à la structure interne de la racine [Zamski and Azenkot, 1981]. Certaines études suggèrent que le stockage du saccharose pourrait être optimisé par une restructuration des cercles de cambium de la racine [Artschwager, 1930 ; Elliott et al., 1986 ; Hosford et al., 1984]. Les auteurs proposent qu'une structure avec davantage de cercles de cambium permettrait d'améliorer la diffusion du saccharose du phloème aux cellules compagnes. L'augmentation du nombre de cercles de cambium engendrerait des cellules de stockage moins épaisses et localisées à proximité du phloème. La concentration en saccharose étant plus forte à la sortie du tissu conducteur, la diffusion dans les cellules de stockage serait alors facilitée.

Des différences de structure interne entre variétés de betteraves sucrières sont déjà observées [Artschwager, 1930]. D'autres études mettent en évidence un contrôle hormonal de la formation du cambium. Il semblerait que les gibbérellines (GA), phytohormones notamment impliquées dans la levée de dormance des graines, seraient à l'origine de l'expansion des cellules de la racine de betterave [Elliott et al., 1986 ; Hosford et al., 1984].

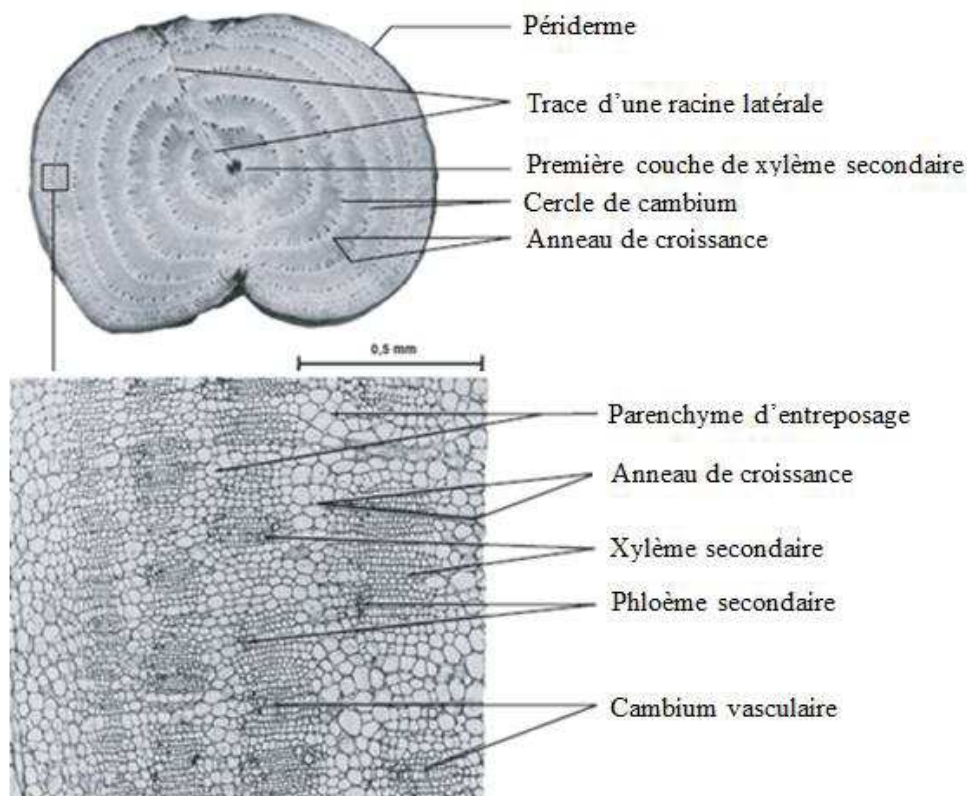


Figure n°5 : Structure interne de la racine de betterave sucrière [Adaptation de Draycott, 2006].

Des études mettent en valeur des différences de résistance aux chocs mécaniques entre variétés. De par leur forme, leur taille et leur structure, certaines variétés seraient plus fermes que d'autres, et donc moins sensibles aux blessures [Gorzelay and Puchalski, 2000]. Les chocs mécaniques engendrent une désorganisation et un affaissement des cellules, une dessiccation et une lignification des cellules [Ibrahim et al., 2001 ; voir la figure n°6], qui peuvent être plus ou moins prononcées en fonction de la variété. Les réactions de défense, dont la cicatrisation fait partie, peuvent être plus ou moins efficaces, plus ou moins rapides en fonction de la variété, et la capacité au stockage peut alors être impactée.

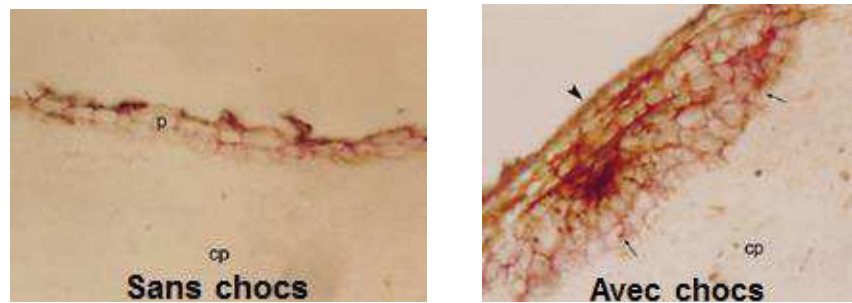


Figure n°6 : Conséquences d'un choc mécanique sur racine de betterave mature [Ibrahim et al., 2001].

À gauche : Arrachage manuel.

À droite : Application d'un choc de 4 joules, 21 jours après l'impact.

p : péricorde ; cp : parenchyme cortical.

Racines traitées au phloroglucinol et analyse par microscopie à champ lumineux → mise en valeur des zones lignifiées.

Les propriétés physiques des racines dépendent de la composition de leur matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci est constituée de fibres et de pectines (gel hydraté) et elle joue le rôle de squelette en conférant de la résistance aux cellules [Draycott, p.423, 2006 ; Vukov and Hangyál, 1985].

La cellulose est la fibre principale. Elle est constituée d'une chaîne linéaire de glucoses, reliés par des liaisons β 1-4. Elle s'organise en micro-fibrilles parallèles les unes aux autres et confère à la MEC une charpente pariétale.

L'hémicellulose est une classe de polymères. Elle est constituée de nombreux monomères et branchements différents, dont notamment les xyloglucanes (chaîne de glucose avec de courtes chaînes latérales de xylose, galactose et fucose). Elle se lie à la cellulose grâce à des liaisons hydrogènes, et maintient alors l'architecture pariétale en liant les fibrilles de cellulose entre elles.

La lignine est une substance d'incrustation composée de monolignols (dérivés indirects de la phénylalanine). Contrairement aux deux autres fibres, elle est hydrophobe et non-déformable. Elle a pour rôle le renforcement de la résistance mécanique de la MEC. Elle s'incruste sur la cellulose, dans les espaces libres.

Finalement, les pectines constituent le ciment de la MEC. C'est un acide polygalacturonique essentiellement, dont certains monomères peuvent être méthylés. Des rhamnoses cassent la linéarité de la chaîne et d'autres oses interviennent, rendant plus complexe l'organisation de la pectine. Les ions calcium interagissent avec les molécules non-méthylées, créant ainsi un gel (voir la figure n°7). Son rôle est de rassembler l'ensemble des fibres pour lier la structure externe des cellules.

Une étude s'intéressant aux propriétés mécaniques des microfibrilles de cellulose démontre que sans pectine, les microfibrilles perdent en rigidité et sont plus souples, plus déformables (diminution du module de Young) en raison d'une cohésion moins forte [Dufresne et al., 1997].

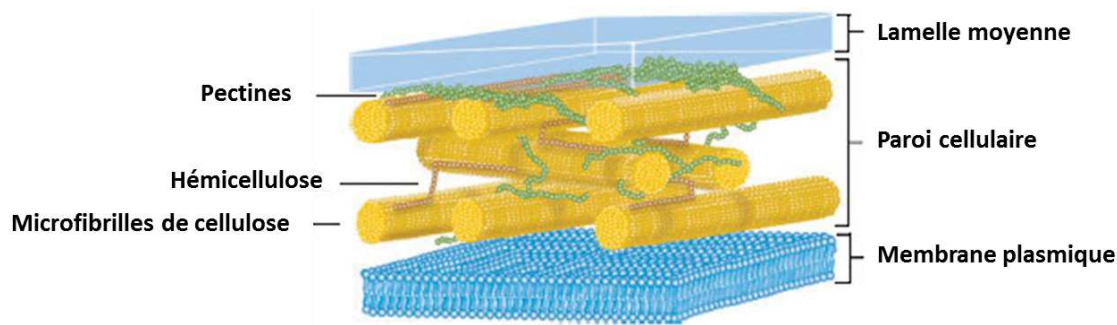


Figure n°7 : Structure externe (MEC) des cellules végétales [Sigma-Aldrich].

La lamelle moyenne constitue la couche la plus externe de la paroi pectocellulosique des cellules. Elle est principalement constituée de pectines, jouant le rôle de ciment intercellulaire. La paroi cellulaire (constituée d'une paroi primaire et secondaire, non illustrées ici) procure à la fois souplesse et élasticité aux membranes, grâce aux microfibrilles de cellulose ; et également résistance physique avec l'association des polymères d'hémicellulose, et du gel de pectine.

ii. Transport du saccharose : anabolisme et catabolisme

Organisme autotrophe, *Beta vulgaris* synthétise ses éléments carbonés dans les chloroplastes de ses feuilles. Le saccharose et les autres éléments carbonés sont ensuite transportés jusqu'à la racine grâce au phloème, tissu conducteur. Une partie des sucres, le glucose et le fructose notamment, est utilisée par la plante pour son développement et le maintien de ses fonctions vitales. L'autre partie comprenant le saccharose, est stockée dans les vacuoles pour constituer les réserves de la plante.

Deux voies de stockage du saccharose sont envisagées [Wyse, 1979].

La première voie est dite symplastique. Le saccharose traverse le cytoplasme des cellules via les ponctuations et les connexions des parois, les plasmodesmes. C'est un transport actif où l'ATP fournit l'énergie nécessaire aux canaux de transport pour véhiculer le saccharose du phloème à la vacuole.

La seconde voie, probablement empruntée au-delà d'une certaine concentration de saccharose (20 mM) lorsque la voie symplastique est saturée, consiste en un transport passif [Saftner et al., 1983]. Le saccharose diffuse du tissu conducteur aux cytoplasmes des cellules de stockage via un gradient de concentration, sans apport d'énergie [Giaquinta, 1979]. Le chemin emprunté est celui des parois cellulaires et des espaces vides, c'est l'apoplaste (voir la figure n°8 pour le transport dans la racine, et la figure n°9 pour le transport des feuilles à la racine).

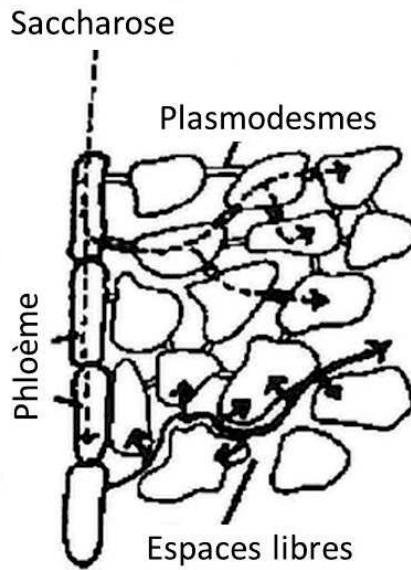


Figure n°8 : Voies de transport du saccharose du phloème aux cellules de stockage [Adaptation de Wyse, 1979].

--> Voie symplastique.
 ==> Voie apoplastique.

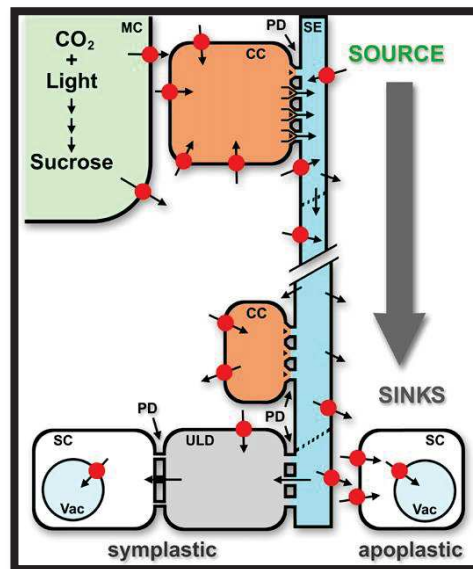


Figure n°9 : Transport du saccharose depuis sa synthèse dans une cellule du mésophylle (partie interne de la feuille, organe source) jusqu'aux cellules "puits" de la racine [Sauer, 2007].

Le saccharose est synthétisé dans les cellules photosynthétiques de la plante grâce aux chloroplastes. Il est ensuite transporté des feuilles vers la racine par le phloème, via différents transporteurs (cercles rouges), soit par voie symplastique, soit par voie apoplastique, pour y être stocké.

CC = Cellule compagne ; PD = Plasmodesme ; MC = Cellule Mésophylle ; ULD = Domaine de non déchargement ; TP = Tonoplaste ; SC = Cellule puit ; SE = Phloème ; Vac = Vacuole.

Au cours de sa diffusion du phloème aux vacuoles, le saccharose peut subir plusieurs transformations. Une fois dans le cytoplasme, le saccharose est hydrolysé en hexoses (glucose et fructose) par la sucrose synthase (SS). L'hydrolyse du saccharose en hexoses peut aussi être réalisée au niveau de la paroi extracellulaire par des invertases acides (CWIV). Les hexoses sont en partie utilisés pour fournir l'énergie et le carbone nécessaires aux fonctions vitales des cellules de la plante, telles que la respiration et la synthèse d'éléments structuraux. L'autre partie est utilisée pour la resynthèse du saccharose au niveau du tonoplaste par la saccharose phosphate synthase (SPS). Cette dernière produit le saccharose-6^F-phosphate, qui est transformé en saccharose par la saccharose phosphate phosphatase (SPP). Cette dernière transformation rend la réaction irréversible et favorise le stockage du saccharose dans les vacuoles [Echeverria et al., 1997 ; Fieuw and Willenbrink, 1990 ; Lunn and MacRae, 2003]. Le transport dans la vacuole s'effectue grâce à un co-transport en sens opposé des cations (H⁺, K⁺ ; voir la figure n°10).

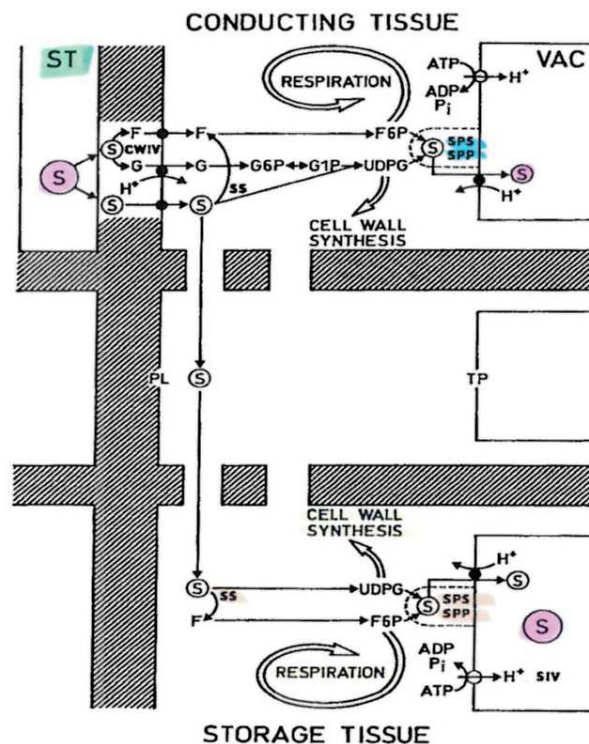


Figure n°10 : Potentielles transformations subies par le saccharose dans la racine de betterave sucrière [Fieuw and Willenbrink, 1990].

S = Saccharose ; F = Fructose ; G = Glucose ; PL = Plasmalemme ; TP = Tonoplaste ; SPP = Saccharose Phosphate Phosphatase ; SPS = Saccharose Phosphate Synthase ; ST = Phloème ; SIV = Invertase acide soluble ; CWIV = Invertase acide de la paroi cellulaire ; VAC = Vacuole.

Plusieurs enzymes et protéines de transport semblent donc impliquées dans le stockage du saccharose dans les racines de betterave. Des études mettent en évidence une modification de l'activité des Inv et de la SS au cours de la période de stockage [Hubbard et al., 1989 ; Klotz and Finger, 2003 ; Wyse, 1978b]. La SS représenterait plus de 90% de l'activité sucrolytique soluble des racines et serait impliquée dans le déchargement du saccharose de la vacuole [Etcheberria and Gonzalez, 2003]. L'activité de la SS connaîtrait un pic après 3 semaines de

stockage et, chez le blé, elle serait stimulée par un choc thermique à 4°C [Calderón and Pontis, 1985]. Les AInv de la vacuole et de la paroi cellulaire semblent davantage impliquées dans la dégradation du saccharose que les invertases alcalines du cytoplasme. L'activité des AInv serait amplifiée par des températures de stockage supérieures à 20°C, et par les blessures de la racine engendrées par les opérations mécaniques telles que l'arrachage, le nettoyage, le chargement/déchargement et le déterrage [Rosenkranz et al., 2001 ; Spackman and Cobb, 2001]. Les activités des AInv et de la SS seraient accentuées par des contaminations microbiologiques. En cas de contamination, des invertases exogènes provenant des champignons sont impliquées également. Par ailleurs, une conversion importante du saccharose en hexoses est reportée dans les 24 heures suivant la récolte. Elle serait due à la phase de cicatrisation, et aux actions des AInv et de la SS pour palier le stress subi par les racines [Vaccari et al., 1988].

La SPS représente une enzyme clef dans le stockage du saccharose [Fieuw and Willenbrink, 1987 ; Hesse et al., 1995]. Elle est localisée dans la racine, et avec la SPP, elle contrôle la synthèse et le stockage du saccharose. À partir de glucose et de fructose, la SPS resynthétise le saccharose au niveau du tonoplaste de la vacuole. La synthèse de la protéine SPS varierait en fonction du stade de développement de la plante, et serait amplifiée dans les cellules source. L'activité de la SPS serait régulée par phosphorylation, et une seule espèce de SPS a été identifiée à ce jour chez la betterave [Fieuw and Willenbrink, 1987].

Les protéines de transport jouent également un rôle essentiel dans le passage du saccharose du phloème aux vacuoles [Boorer et al., 1996 ; Saftner and Wyse, 1980, Sauer, 2007]. Un transport actif de type antiport H⁺/saccharose semble impliqué dans le stockage dans la vacuole, avec un rôle essentiel de l'ATP. D'autres transporteurs pourraient s'avérer important.

Dans le stockage du saccharose, la bétaine jouerait également un rôle essentiel. C'est un ammonium quaternaire, dérivé d'acides aminés, aussi appelé triméthylglycine ou glycine bétaine. C'est le composé soluble non-sucre majoritaire dans la racine. Elle agirait comme un osmoprotectant, en assurant l'équilibre de la pression osmotique des cellules (osmolyte cytosolique). De ce fait, elle serait liée aux teneurs en saccharose. Plus il y a de saccharose synthétisé dans les vacuoles, plus les molécules d'eau sont mobilisées (mouvement de l'eau du milieu le moins concentré vers le plus concentré). Afin d'éviter l'éclatement des cellules et afin d'assurer un retour à l'équilibre osmotique, les molécules de bétaine vont s'accumuler dans le cytoplasme en même temps que le saccharose s'accumule dans la vacuole [Beringer et al., 1986]. Elles assurent ainsi l'intégrité des membranes et interviennent en cas de stress abiotique. En milieu à salinité élevée, les teneurs en bétaine des feuilles et de la racine peuvent être multipliées par deux ou trois [Hanson and Wyse, 1982 ; Russel et al., 1998].

La bétaine est synthétisée dans les feuilles et est transportée jusqu'à la racine via le phloème. Dans le jus sucré, ses teneurs avoisinent les 5 à 10 g/100 g de sucre. Même si elle apparaît utile pour le stockage du saccharose, des teneurs trop élevées sont néfastes au processus industriel et au rendement en sucre. En effet, la synthèse d'une mole de bétaine correspond à l'énergie dépensée pour une mole de saccharose [Hitz et al., 1981] ; et la bétaine interfère dans la cristallisation, en déformant les cristaux de sucre [Zielke and Snyder, 1973]. Des

différences variétales ont également été observées : les variétés aux richesses élevées seraient accompagnées de teneurs en bêtaïne élevées [Beringer et al., 1986].

Investi dans la valorisation de ses coproduits, Tereos a mis en place, en partenariat avec Danisco, société danoise dans le domaine des biotechnologies naturelles, un atelier d'extraction et de purification de la bêtaïne sur le site d'Origny-Ste-Benoite. Extraite à partir des vinasses (issues de la fermentation des mélasses pour la production de bioéthanol), la bêtaïne est utilisée en nutrition, animale notamment, pour améliorer la santé intestinale et réduire l'impact négatif du stress dû à la chaleur.

iii. Aspect variétal

Certains articles scientifiques et des essais en interne mettent en valeur des différences variétales au cours du stockage (comme mentionné précédemment). Ces différences s'accroissent avec la durée du stockage, et au vu des futures longues campagnes, il est intéressant de ne pas négliger le facteur variété.

Depuis 2008, des essais conservation/varieties sont mis en place par le service agronomique de Tereos. Des sacs de variétés différentes sont stockés de début octobre à mi-décembre (cumul d'environ 600°j ext). Les différences sont significatives après un stockage d'un cumul de températures extérieures supérieures à 300°j ; et il est observé des différences de taux de pourriture de 5 % entre les variétés extrêmes (variétés sensibles aux contaminations : 9 % ; variétés résistantes : 4 %) [Tereos, 2013].

Les articles scientifiques mentionnent des différences de taux de respiration entre les variétés, en lien avec la morphologie des racines, comme vu précédemment [Akson and Stout, 1980 ; Haagensohn et al., 2006] ; des différences de résistances aux maladies, notamment au *Botrytis cinerea* et *Fusarium* [Bugbee, 1979 ; Campbell et al., 2011 ; Gaskill, 1950] ; des différences relatives aux chocs mécaniques [Gorzeleny and Puchalski, 2000]. Également, des différences d'activités sucrolytiques [Martin et al., 2001a ; Haagensohn et al., 2006] et de résistance aux cycles gel/dégel [Peto, 1952 ; Wood, 1952].

La sélection variétale s'est adaptée au cours du temps. Désormais, en plus de l'équilibre poids/richeesse, la régularité sur plusieurs années, l'aptitude à limiter la tare terre, la résistance à la montée en graine et la tolérance aux maladies, elle prend désormais en compte l'aptitude au stockage de longue durée.

Chaque année, 50 variétés sont proposées, et en moyenne, une variété reste sur le marché 3 ans. Dans le cadre de la thèse, Tereos a souhaité approfondir ses connaissances sur les différences variétales au cours du stockage. Pour ce faire, un partenariat avec un semencier a été signé, et des essais en silo ont été dirigés sur deux ans, afin d'effectuer des analyses laboratoires précises et innovantes.

À travers cette lecture, il apparaît que la structure de la racine, son organisation cellulaire, son métabolisme et sa composition biochimique sont les principaux facteurs physiologiques qui caractérisent la racine de betterave sucrière, et impactent le stockage du saccharose. En fonction de sa résistance physique et de son activité métabolique, dépendantes en partie de la

variété, la racine sera plus ou moins riche (concentration en saccharose), et plus ou moins adaptée au stockage de longue durée. De ce fait, il est important d'approfondir l'étude de l'aspect variétal dans les perspectives de longues campagnes.

D'autres facteurs interviennent, et conditionnent la richesse de la racine. Au cours du développement de la plante, pendant la récolte et pendant le stockage en silo, plusieurs facteurs environnementaux interagissent, et sont responsables de pertes plus ou moins importantes de saccharose.

d) Facteurs environnementaux

i. Le climat

Comme vu précédemment, la conservation des betteraves en silo sur une longue durée est fortement dépendante du climat. Au vu de l'allongement des campagnes, des précautions sont à prendre dès la récolte pour optimiser le stockage.

Ces précautions passent par le soin de ne pas récolter en conditions pluvieuses. D'une part, parce que l'humidité est enfermée dans le silo et crée des conditions optimales de croissance aux micro-organismes ; d'autre part, parce que la terre reste collée aux racines, limitant ainsi leur respiration, et conduisant à la fermentation. De plus, la quantité de terre présente dans le silo est pénalisée sur la recette finale du planteur, c'est la tare-terre. Cette tare n'englobe pas uniquement la terre présente dans un silo, mais également les cailloux, feuilles et autres éléments en provenance du champ qui représentent des déchets pour l'industrie sucrière. La tare-terre est obtenue grâce à une pesée, avant et après lavage d'un échantillon de racines d'un camion. Elle est exprimée en pourcentage du poids net de betteraves (voir l'équation 5).

Dans la recette du planteur, le taux de betteraves non marchandes (BNM) est également comptabilisé. Il s'agit des betteraves, ou parties de betteraves, contaminées qui ne contiennent plus de saccharose extractible. Ce taux est estimé par la pesée des épiluchures de racines contaminées de l'échantillon lavé. Le calcul de la recette est consultable [en annexe n°3](#).

$$5) \text{ Tare-terre (\%)} = \frac{[\text{Poids brut de l'échantillon} - (\text{Poids net de l'échantillon} + \text{Poids de BNM})]}{(\text{Poids net de l'échantillon} + \text{Poids de BNM})}$$

Les poids sont exprimés en kg.

En restant dans le domaine de la climatologie, les températures lors de l'arrachage et de la confection des silos ont également un impact sur la conservation des racines.

Par exemple, aux États-Unis, si les températures en journée sont trop élevées, les arrachages sont programmés de nuit. Une prise de la température des racines est faite aux centres de réception. C'est la règle des 12,7 °C qui s'applique. Au-delà de cette température, l'arrachage est à éviter. Avec 6°C supplémentaires, les pertes en sucre en silo sont doublées [Amalgamated Sugar Company, 2015 et 2016].

En France, chez Tereos, c'est la règle des 250°j (cumul de températures extérieures) qui est appliquée pour déterminer la durée de stockage limite des silos. Au-delà de ce cumul de

température, il est considéré que les pertes en sucre pour un stockage en silo ne sont plus linéaires (de l'ordre de 2 %, en lien avec la respiration et la cicatrisation) mais exponentielles, en lien avec le développement de pourriture [Tereos, de 2003 à 2017] (voir la figure n°11).

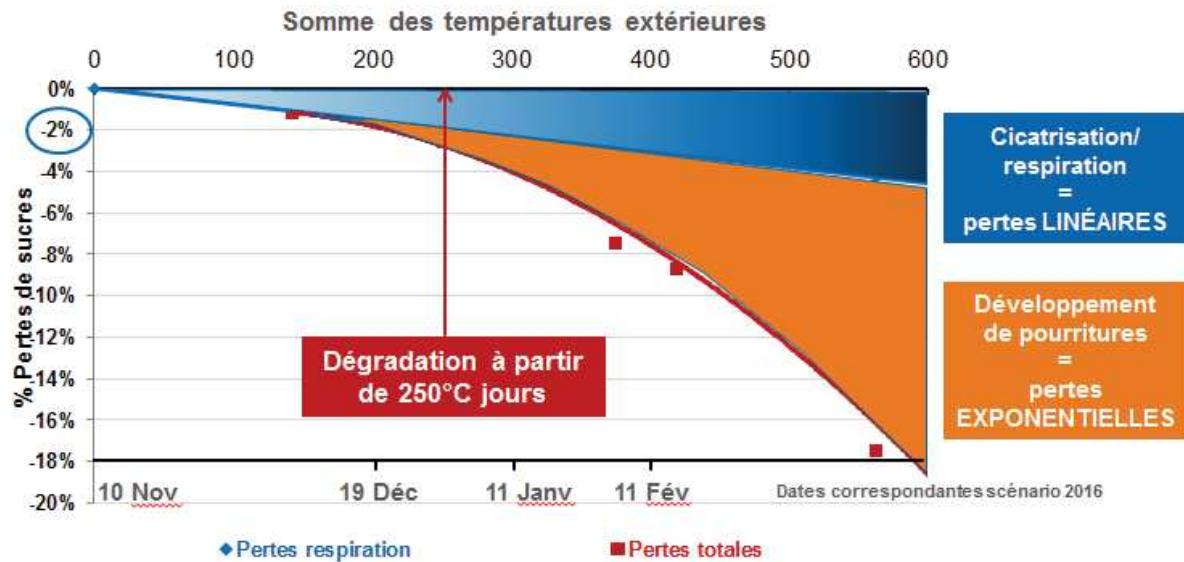


Figure n°11 : Pertes en sucre en fonction du cumul des températures lors d'un stockage en silo [Tereos, 2015].

Les pertes par respiration ont été déterminées grâce au stockage de sacs arrachés manuellement.

Avec l'allongement des campagnes, les silos vont être davantage exposés à des températures négatives (stockage de fin novembre à fin janvier). Une racine gèle en dessous de -3°C [Peto, 1952]. L'extraction du sucre d'une betterave congelée ne pose pas de problème, mais le climat du Nord de la France ne permet pas de conserver les racines congelées. Le dégel va entraîner une dégradation rapide des racines, avec une lyse des cellules qui libère le saccharose et attire les pathogènes, notamment les bactéries.

Depuis 2009, le service agronomique de Tereos met en place des essais de protection sur des silos de stockage de longue durée [Tereos, 2009-2017]. Que ce soit contre le gel, la chaleur ou la pluie, des solutions existent et ont été testées.

Pour lutter contre le gel, une bâche en fibre de polypropylène imperméable et respirante (géotextile) a été testée et a obtenu des résultats satisfaisants pour la protection des silos (voir la figure n°12a). Grâce à son imperméabilité et son aération, cette bâche permet au silo de s'assécher sans élévation de la température et de diminuer la terre dans le silo d'environ 20 % par rapport à un silo témoin [Tereos, 2013]. En 2017, une autre bâche géotextile aux propriétés imperméables supposées supérieures à la première a été testée. D'autres essais en conditions plus humides ont été conduits et ont permis de conclure sur l'efficacité de cette bâche.

Un autre moyen est testé depuis 2008, il s'agit du paillage (voir la figure n°12b). Celui-ci offre également une protection efficace contre le gel, mais pourrait être complété par une bâche géotextile en cas de pluie. En effet, la bâche permet de protéger contre la pluie, et son installation sur la paille permet de renforcer l'efficacité contre le gel tout en palliant le problème d'absorption de l'eau en cas de pluie. Les règles du paillage sont de procéder sur un

silos nivelés avec une pailleuse/hacheuse (brins de 5 cm de long), pour une épaisseur de 10 à 15 cm (environ 400 kg de paille / 100 t de racines).

Des essais en interne (2010) montrent que le paillage réduit de moitié l'épaisseur de betteraves gelées sur un silo (environ 80 cm pour un silo témoin, contre 40 cm pour un silo paillé, et 30 cm pour la bâche géotextile) [Tereos, 2010]. Cependant, aucune différence significative concernant la richesse et les betteraves non-marchandes (BNM) entre un silo témoin et un silo protégé n'a été mesurée jusqu'à présent.



a) La bâche géotextile

b) Le paillage

Figure n°12 : Moyens de protection mis en place contre le gel [Tereos, 2013].

ii. Les pathogènes des racines

Une autre précaution est d'être vigilant sur l'état sanitaire des racines récoltées, et d'isoler celles qui sont contaminées. Ne sont prises en compte ici que les maladies racinaires (les maladies foliaires sont abordées un peu plus loin dans ce chapitre). Les champignons sont les principaux nuisibles au stockage des racines, notamment *Phoma betae*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium claviforme* [Bugbee, 1982]. Se retrouve également le Rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*) et violet (*Rhizoctonia crocorum*, aussi appelé *Rhizoctonia violaceae* ou *R. aspargi*), l'*Aphanomyces cochlioides*, le Rhizopus (*Rhizopus stolonifer* et *R. arrhizus*), ou encore *Fusarium culmorum*. Ces champignons sont présents dans le sol. De ce fait, en plus de la présence de racines contaminées dans les silos, la terre ramenée du champ amplifiera la propagation des contaminations en silo. Certains articles démontrent qu'une contamination par *Aphanomyces* multiplie le taux de respiration des racines par quatre au cours du stockage [Campbell and Klotz, 2006b]. 20 % de la surface racinaire infectée double le taux de respiration et triple la concentration en hexoses [Mumford and Wyse, 1976]. La synthèse de kestoses, trisaccharide formé par l'addition d'une unité fructose sur le saccharose, est également reportée en cas de contaminations microbiologiques [Klotz and Campbell, 2002 ; Oldfield et al., 1971b].

Certaines bactéries sont également néfastes au stockage des racines, notamment *Leuconostoc mesenteroides* [Tallgren et al., 1999]. En cas de gel-dégel, ces bactéries s'introduisent dans les racines et forment alors un gel de polysaccharides (dextranes), apparenté à une substance gluante engendrant des problèmes de filtration en process [Oldfield et al., 1971b].

Pour ralentir les contaminations microbiologiques, l'application de chaux sur les racines arrachées a montré des résultats encourageants dans des essais en interne. Dans le cadre de l'essai conservation longue durée planifié chaque année par le service agronomique, la chaux est appliquée sur les racines à l'aide de pulvérisateurs avant la mise en sacs (2 L/T avec un produit concentré à environ 400 g de chaux/L). Dans le cadre des essais de stockage de longue durée, mis en place sur plusieurs sites industriels en 2016, un pulvérisateur est installé en fin de chantier (grue élévatrice) et les racines sont enrobées juste avant la mise en silo.

Depuis 2015, des essais avec des pulvérisateurs installés sur les turbines de nettoyage sont mis en place (voir les figures n°13a et n°13b). Une fois arrachées, les racines sont pulvérisées à la chaux, puis stockées en silo.

Les résultats montrent que le chaulage réduit de 4,4 % le taux de pourriture [Tereos, 2015].

De par ses propriétés basiques, la chaux agit en formant une couche protectrice sur les racines. Elle n'empêche pas les contaminations, mais les ralentit.



a) Turbines de nettoyage de l'arracheuse équipées d'un pulvérisateur à chaux



b) Silo de racines chaulées

Figure n°13 : Essai conservation en silo chaulé [Tereos, 2015].

iii. La récolte

Un autre facteur à prendre en compte pour optimiser la conservation des racines est l'arrachage. En fonction des réglages des machines, les racines sont plus ou moins blessées, et donc plus ou moins susceptibles d'être contaminées par les pathogènes. En effet, les arracheuses (automotrices ou intégrales, voir l'annexe n°4a et n°4b) sont équipées de scalpes pour l'effeuillage ; de socs, disques ou roues Opel pour l'arrachage ; et de tables à rouleaux et turbines de nettoyage pour le déterrage (voir les figures n°14a, n°14b et n°15). En fonction de la hauteur des scalpes, des tables, de la vitesse de la machine et des roulements des organes de nettoyage, le scalpage et le déterrage sont plus ou moins intenses et les racines subissent des chocs plus ou moins fréquents, et plus ou moins violents. Elles sont donc plus ou moins blessées en fonction des réglages des équipements et perdent alors plus ou moins de saccharose au cours du stockage [Rosenkranz et al., 2001].

Tereos sensibilise les planteurs à des réglages adaptés aux conditions de récolte, de façon à obtenir des racines légèrement scalpées sans excès de blessures (voir la figure n°16). Mais la décision finale appartient aux planteurs, voire à l'ETA, dont l'objectif premier est l'efficacité du chantier d'arrachage (rapidité), d'éviter les repousses et de ne pas avoir de tare-terre en excès.

Les résultats d'un essai interne montrent qu'un arrachage agressif provoque 4,5 fois plus de pourriture qu'un arrachage classique en fin de stockage (8 semaines ↔ 406°j en 2017), se traduisant par 3,6 fois plus de pertes en sucre [Tereos, 2017].



a) Scalpe pour l'effeuillage



b) Roues Opel pour l'arrachage

Figure n°14 : Éléments de structure des arracheuses [Grimme, 2016].



Figure n°15 : Table à rouleaux pour le déterrage [Grimme, 2016].



Figure n°16 : Recommandations pour le scalpage des racines à la récolte [Tereos, 2015].

iv. Le sol

Le climat, l'agressivité de la récolte et les pathogènes vont donc conditionner la qualité industrielle (ou encore l'état sanitaire) des racines au cours du stockage. Le sol et l'itinéraire technique de la culture sont à prendre en compte également.

La structure, la nature et la composition du sol entrent en jeu dans le développement de la plante, et conditionnent la capacité au stockage des racines.

Tout d'abord, le travail du sol a son importance. Le non-labour ou encore les techniques intermédiaires comme le strip-till, limitent l'érosion et favorisent la population microbologique. Un article du *Paysan Tarnais*, paru en 2006, sur les enjeux et perspectives du travail du sol sans labour, mentionne que la biomasse microbienne augmente de 327 %, et la biomasse lombricienne de 527 %. Le sol est alors plus aéré, avec une densité de matière sèche augmentée, une résistance au cisaillement et à la pénétration plus forte ; et également plus humide, avec l'eau qui s'infiltré plus facilement. Le sol conserve alors ses propriétés nutritionnelles, et les levées après semis sont facilitées [Cavalaris and Gemtos, 2002].

Différents types de sol se retrouvent dans les parcelles Tereos : le limon (région Nord-Pas-de-Calais, Picardie et Seine-et-Marne) ; le sol de craie et argilo-calcaire (région Champagne-Ardenne) ; et le sol argileux (région Centre). Il est observé qu'avec un sol argilo-calcaire, aux propriétés plus basiques que les autres types de sol, le développement de pourriture est faible (rejoignant les observations des essais chaulage : un enrobage basique des racines ralentit le développement de pourriture).

La rotation des cultures joue un rôle essentiel dans la structure et la composition du sol. Elle permet de renouveler la biomasse microbienne (limitation des risques d'infection), de ne pas épuiser les mêmes réserves minérales d'année en année, et de restructurer le sol. En culture de betteraves sucrières, le colza, le maïs, l'orge et le blé sont souvent privilégiés. Les céréales à paille qui sont des cultures non hôtes (risque sanitaire réduit) peuvent avoir un système de

rotation sur 2 ans seulement, contrairement aux autres cultures qui tournent tous les quatre ans (voir le tableau n°2).

Fréquence de rotation betterave	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
4 ans	Betterave	Blé	Colza	Blé	Betterave
4 ans	Betterave	Blé	Maïs	Blé	Betterave
4 ans	Betterave	Blé	Pommes de terre	Blé	Betterave
3 ans	Betterave	Blé	Colza	Betterave	Blé
2 ans	Betterave	Blé	Betterave	Blé	Betterave

Tableau n°2 : Exemples de systèmes de rotation de culture [Tereos, 2016]

Par ailleurs, les CIPAN offrent de nombreux intérêts pour la betterave et deviennent une nécessité réglementaire [Tereos, 2016]. Ces cultures limitent l'érosion et le ruissellement, permettent de fixer le carbone et l'azote dans le sol, assurent un biocontrôle et favorisent la faune. Il s'agit de la moutarde, de la vesce, du radis, du trèfle d'Alexandrie, de l'avoine et de la phacélie (à utiliser en mélange crucifère/légumineuse pour améliorer la production de biomasse notamment, et réduire la dose conseil d'environ 20 unités).

Concernant la fertilisation du sol, l'apport en azote est délicat chez la betterave. Un besoin de 220 kg d'azote/ha est estimé pour assurer le développement de la plante ; mais une sur-fertilisation serait néfaste au rendement en sucre. Une perte de 5,6 % de richesse serait causée par de fortes concentrations en azote [Ulrich, 1954 ; Winzer et al., 1996]. Celles-ci bénéficient à la biomasse foliaire, au détriment de la croissance racinaire [ITB, 2004]. Avant les semis, des analyses de sol sont effectuées afin de déterminer les quantités d'azote disponibles (reliquets). Si celles-ci sont insuffisantes, des compléments sont apportés avant le semis.

Le potassium est également un minéral majeur, indispensable au bon développement des plantes. Contrairement à d'autres cultures, la betterave peut se procurer l'ion K^+ aisément grâce à la profondeur de sa racine [Cakmak, 2005]. Chez la betterave sucrière, un apport en potassium aurait des effets sur le long terme, avec des résultats mesurables huit jours après le traitement. La teneur en potassium de la plante augmentera graduellement et pourra être doublée voire triplée avec une application de 10 mM. Avec cette concentration, le développement foliaire est accéléré ainsi que l'activité synthétique, et l'assimilation du saccharose dans les vacuoles est alors augmentée (avec 95 mM, l'assimilation est environ trois fois plus importante, voir la figure n°17) [Conti and Geiger, 1982 ; Terry and Ulrich, 1973 ; Saftner and Wyse, 1980].

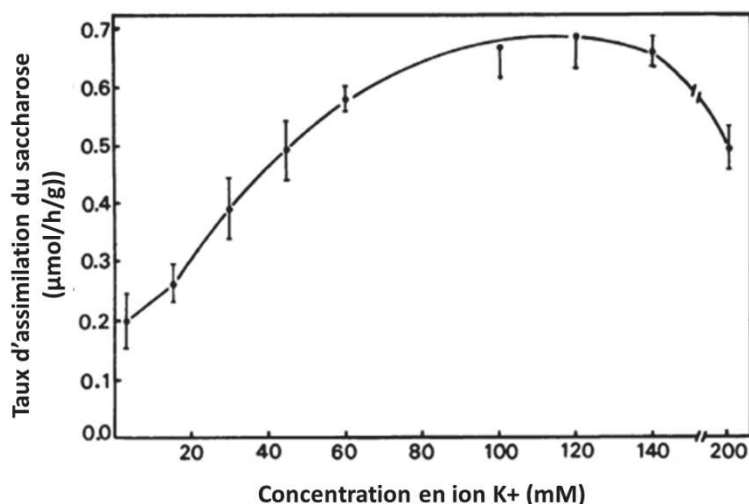


Figure n°17 : Effet des concentrations en K⁺ sur le taux d'assimilation du saccharose dans la racine de betterave sucrière [Adaptation de Saftner and Wyse, 1980].

D'autre part, les teneurs en minéraux, notamment en sodium, auront un impact direct sur le procédé sucrier. En effet, les minéraux acidifient le jus de betterave et engendrent alors la dégradation du saccharose [El-Sheikh and Ulrich, 1970 ; Huijbregts, 2003].

L'entretien de l'état sanitaire des parcelles doit également être géré avec précaution, par l'utilisation de fongicides et pesticides adaptés, pour lutter contre les maladies foliaires. Si les maladies racinaires sont nuisibles en silo, les contaminations au niveau des feuilles vont nuire au développement de la racine et provoquer des pertes de rendement importantes. En effet, les racines affaiblies sont alors prédisposées aux contaminations microbiologiques [Smith and Ruppel, 1971].

Pour accompagner les planteurs dans la lutte contre les maladies foliaires, Tereos communique ses recommandations, notamment via les Agroinfos. La prise en compte des risques agronomiques (localisation de la parcelle, irrigation, fréquence de rotation de culture, technique de labour,...), du respect des seuils d'intervention (% de plantes touchées) et le choix d'un produit adapté sont essentiels pour le contrôle des maladies foliaires [Tereos, 2017]. L'ensemble des traitements mentionnés ci-dessous sont appliqués en curatif. La prévention se traduit par des contrôles réguliers de l'état des parcelles.

Parmi elles, la cercosporiose (*Cercospora leaf spot*) est l'une des plus répandue et des plus destructives (voir la figure n°18a). Elle est causée par un champignon appartenant à la classe des ascomycètes, et peut causer jusqu'à 15 T/ha de pertes de rendement. L'hyphe du champignon s'introduit dans la partie intracellulaire des feuilles (ou des graines) et donne naissance à plusieurs spores (conidies) qui vont assurer le développement du champignon. En conditions favorables (96 % d'humidité et 10°C), les conidies vont se disperser et causer la nécrose d'une partie ou de la totalité des feuilles [Ruppel et al., 1986].

Tereos préconise les fongicides Amistar Xtra et Priori Xtra (Syngenta) pour une efficacité maximale.

L'oidium (*Erysiphe betae*) est une maladie très fréquente chez la betterave, et peut occasionner des pertes de rendement entre 5 et 10 T/ha [Luterbacher et al., 2004 ; Ruppel and Tomasovic, 1977]. Également causée par un ascomycète, elle est décelable sur les feuilles jeunes et matures, de deux à six mois après le semis. Les feuilles sont alors recouvertes d'un feutrage blanc et les tissus sont chlorosés (perte de leur capacité photosynthétique ; voir la figure n°18b). Les fongicides mentionnés contre la cercosporiose seraient efficaces contre l'oidium ; mais également Fortress (Dow AgroSciences), Spyrale (Syngenta), Monnaie, Player (BASF Agro) et Resonance (Phyteurop).

La rouille (*Uromyces beticola*) est une maladie classique causée par un champignon (mêmes pertes que l'oidium). Des pustules de un à deux millimètres de diamètre se dessinent sur les feuilles (voir la figure n°18c), et peuvent même infecter les graines, donc les jeunes pousses [Pool and McKay, 1914]. Cette maladie nuit au rendement en engendrant notamment un vieillissement prématuré des feuilles. Amistar Xtra et Priori Xtra (Syngenta) seraient efficaces avec des seuils d'intervention respectés.

Trois autres maladies, moins préjudiciables aux rendements, sont également communes chez la betterave. Le pied noir de la betterave est causé par le champignon *Phoma betae*. Il cause des lésions aux graines et aux feuilles, accompagnées d'anneaux de couleur foncée dans lesquels se développent les pycnides (structure reproductrice enfermant les conidies ; voir la figure n°18d). Il peut se développer sur le collet également, par une pourriture sèche de couleur noire/brune. Pour limiter son infestation, un système de rotation des cultures en 4 ans est recommandé [Bugbee and Soine, 1974].

La ramulariose (*Ramularia beticola*) attaque les feuilles matures en leur dessinant des tâches brunâtres de quatre à sept millimètres de diamètre, de forme angulaire (voir la figure n°18e). En s'étendant, les lésions peuvent fusionner et causer la mort des feuilles et la défoliation. En raison de son apparition tardive, elle ne cause pas de dégâts économiques importants [Byford, 1996].

Une autre maladie caractéristique des feuilles matures est causée par les champignons du genre *Alternaria* (*A. alternata* et *A. brassicae*). Ils engendrent des lésions de couleurs marron foncée à noire, de deux à dix millimètres de diamètre, à l'origine du nom de « maladie des tâches noires » (voir la figure n°18f).

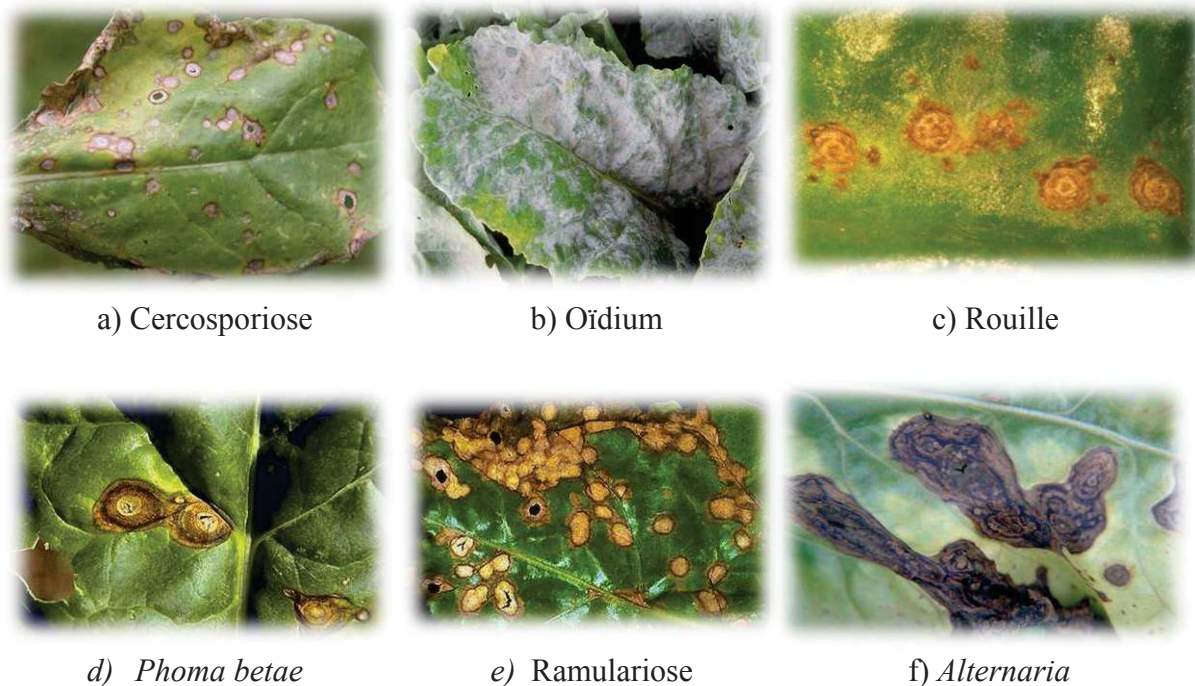


Figure n°18 : Maladies foliaires [Tereos, 2016]

e) Le biocontrôle en faveur du stockage longue durée

Pour toute entreprise, il est désormais important d'être sensible à son empreinte écologique et de favoriser les actions en faveur d'un développement durable. Depuis environ 2010, Tereos est impliquée dans la responsabilité sociale des entreprises (RSE) et agit en faveur des économies d'énergies, de la sensibilisation de ses employés au développement durable et du déploiement de stratégies respectueuses de l'environnement. Les cinq piliers de la stratégie RSE du groupe sont l'agriculture durable, l'industrie positive, la garantie produit, le développement local et la nutrition.

Au niveau agronomique, les produits de biocontrôle semblent adaptés à cette nouvelle optique. Dans le cadre de la thèse, il est intéressant de trouver des applications au champ ou en silo, qui agissent en amont du stockage de façon à renforcer la résistance physique des racines, ou encore à activer les réactions de défense.

En 2016, cinq traitements ont été testés au champ. Ils ont été sélectionnés suite à une recherche bibliographique et suite à des échanges avec des commerciaux d'entreprises phytopharmaceutiques. Le descriptif des produits ainsi que les résultats des tests sont présentés dans le chapitre 4.

Dans la recherche de solutions innovantes, le principe de la résistance systémique induite a orienté l'intérêt sur deux produits à base de bactéries.

Ces dernières seraient capables d'induire la résistance de la plante par l'activation de ses défenses naturelles, sans porter préjudice à son développement, et son état sanitaire [Jacobsen et al., 2004 ; Thrane et al., 2000]. L'induction des défenses se généraliserait à la plante

entière : des feuilles, aux racines (résistance systémique) ; et ne serait pas spécifique à des infections particulières, mais capable de protéger la plante contre différents pathogènes [Nielsen et al., 1998 ; Peng and Kuc, 1992].

L'application de ces produits induirait un stress oxydant chez la plante, à l'origine de la synthèse de molécules toxiques pour lutter contre les pathogènes, et de l'activation de la lignification des parois cellulaires de la plante (action de peroxydases) [Bargabus et al., 2002 ; Peng and Kuc, 1992]. Des enzymes de dégradation des parois des champignons seraient également activées (chitinases et glucanases), sans apparition de nécroses, ni d'autres dégradations physiologiques de la betterave [Bargabus et al., 2002 ; Legrand et al., 1987].

Les résultats attendus lors des essais sont des taux de pourriture plus faibles que ceux des racines non traitées (témoin) en fin de stockage. Le renforcement du « système immunitaire » des racines avant la récolte serait une source de profit pour l'industrie sucrière.

La qualité agronomique des racines a donc une importance majeure sur la conservation en silo, et elle est étroitement liée à la qualité industrielle des racines. Cette dernière est notamment dépendante de l'itinéraire cultural, des conditions de récolte et de stockage en silo. Il a été rapporté précédemment qu'au cours du stockage, le saccharose est transformé en d'autres composés, pour permettre à la racine de survivre dans ce nouvel environnement. Une dégradation trop importante du saccharose cause des problèmes en process industriel, en raison de la production de molécules indésirables.

En effet, en plus des pertes en saccharose au cours du stockage, des molécules nuisibles au procédé sucrier sont synthétisées. Il s'agit de sucres réducteurs (glucose et fructose), de polymères (dextranes, raffinose), et de produits de fermentation (alcools et acides organiques) principalement. Ceux-ci vont, par exemple, bloquer les filtres en process, acidifier et colorer les jus, ou encore altérer la morphologie des cristaux de sucre [Mantovani and Fagioli, 1964 ; Oldfield et al., 1971b ; Reinefeld, 1975].

2) Orientation industrielle

a. Molécules issues de la dégradation du saccharose en lien avec la qualité industrielle

La dégradation de la betterave durant le stockage est préjudiciable à plusieurs niveaux. Tout d'abord, au niveau du planteur, car la perte de saccharose au cours du stockage impacte directement la recette.

Ensuite, au niveau de l'industrie sucrière. Après l'achat au planteur, les betteraves sont stockées en moyenne 2 jours supplémentaires pendant lesquels une perte de richesse est mesurée et où l'industrie ne travaillera pas le saccharose acheté.

Enfin, au niveau du procédé sucrier. Certains produits de dégradation du saccharose engendrent des complications dans les étapes du process, notamment en filtration, épuration et cristallisation. Ces points sont développés dans le document rédigé par Ciara Meade ; ici, seules les études traitant des molécules issues de la dégradation du saccharose sont abordées.

Premièrement, les hexoses, automatiquement synthétisés suite à la dégradation du saccharose, comme vu précédemment. Que ce soit pour subvenir aux besoins vitaux de la racine (respiration et énergie) ou aux réactions de défenses, le fructose, et le glucose principalement, se retrouvent systématiquement synthétisés pendant le stockage des racines. Leurs concentrations sont augmentées en présence de blessures et de contaminations microbiologiques [Campbell and Klotz, 2006, 2008 ; Rosenkranz et al., 2001]. Les hexoses sont néfastes au process car en réagissant avec les acides aminés lors de l'extraction du jus (76°C, pH 6), la réaction de Maillard se produit et le jus est alors coloré. Un jus avec une coloration trop élevée ne produira pas un sucre blanc de qualité. Le calcul de la coloration est écrit en équation 6. Un sucre avec une coloration inférieure à 8 points CEE est classé dans la première catégorie (supérieure), entre 8 et 20 points, il est classé en seconde catégorie.

$$6) \text{ Coloration (points CEE)} = \frac{100000 \cdot \text{Absorbance}}{l \cdot u \cdot c}$$

Où :

l : longueur de la cuve (10 cm)

c : brix volume pour une dilution à 50 brix (soit 61,43 g % mL)

u : unités ICUMSA correspondant à 1 point CEE (soit 7,5)

Ensuite, le raffinose, un trisaccharide issu de la dégradation ou transformation endogène du saccharose [Haagenson et al., 2008]. Il agirait comme osmoprotectant et capteur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Nishizawa et al., 2008]. Le raffinose serait impliqué dans la résistance de la plante face à un stress abiotique, notamment le gel. Sa synthèse serait stimulée par un stockage à des températures inférieures ou égales à 3°C et d'une durée supérieure à 10 semaines. La Galactinol Synthase (GS) participerait à la synthèse du raffinose (voir la figure n°19). L'enzyme responsable de la dégradation du raffinose est l' α -Galactosidase. Le raffinose serait en partie responsable de la perte de rendement des betteraves et impliqué dans

le ralentissement du procédé par une diminution du taux de filtrabilité des jus et une altération de la morphologie des cristaux de sucre [Morel du Boil, 1991 ; Ramos and Ravelo, 2009].

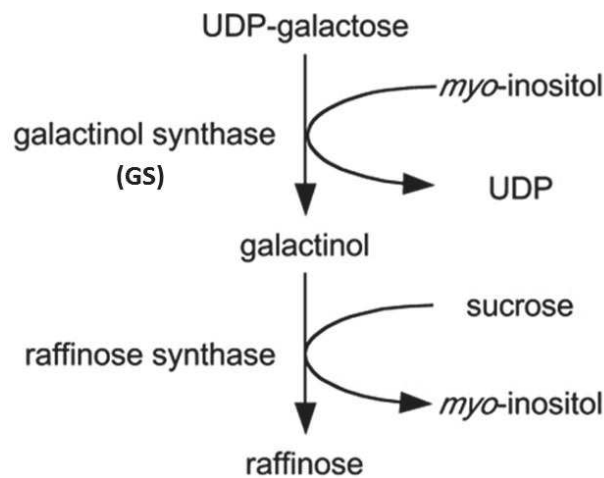


Figure n°19 : Synthèse du raffinose [Nishizawa et al., 2008]

Le galactose est un épimère du glucose (configuration différente de la molécule sur un carbone). Par l'action de la GS, il est transformé en galactinol dont l'unité galactosyle est transférée sur le saccharose par la raffinose synthase pour former le raffinose.

Un autre trisaccharide rapporté par la littérature serait nuisible à la cristallisation du sucre. Il s'agit du kestose, molécule avec une unité fructosyle transférée sur le saccharose. Il est synthétisé par l'activité fructosyl-transférerase des invertases, sous forme de 1-kestose, 6-kestose et *neo*-kestose [Allen and Bacon, 1955 ; Hawker, 1985]. Les invertases seraient d'origine microbienne, en raison de l'inexistence de kestose dans les racines saines. Et des concentrations de l'ordre de 1,2 g/100 g de saccharose ont été rapportées dans des racines contaminées [Oldfield et al., 1971b].

D'autres molécules issues de la dégradation exogène du saccharose au cours du stockage ont été rapportées, notamment, les dextrans et les levanes. Ceux-ci sont produits par des bactéries suite à un cycle gel-dégel [Eggleston, 2002 ; Tallgren et al., 1999 ; Oldfield et al., 1971b].

Les dextrans sont des polysaccharides constitués de plusieurs molécules de glucose et produits par des bactéries du genre *Leuconostoc*. Ces bactéries possèdent la dextrane saccharase, enzyme capable de synthétiser des liaisons glucosidiques de plusieurs types.

Les levanes, présents en plus faibles proportions, sont constitués de polymères de fructose [De Bruijn, 2000 ; Shore et al., 1983]. Ils sont synthétisés par la levane saccharase, produite notamment par *Pseudomonas fluorescens*. Ces polysaccharides forment des gels, responsables de l'augmentation de la viscosité du jus et donc, du ralentissement du procédé sucrier.

Le mannitol est à prendre en compte également. C'est un polyol issu de l'action de la mannitol déshydrogénase (MDH ; voir la figure n°20) produite par des bactéries du genre *Leuconostoc* et d'autres microorganismes [Eggleston, 2002 ; Eggleston et al., 2008]. Il est responsable de l'acidification des jus par la perte de ses ions H⁺ et pourrait être utilisé comme indicateur de contaminations.

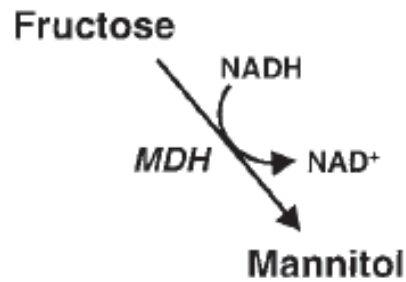


Figure n°20 : Synthèse du mannitol par *Leuconostoc* [Grobben et al., 2001].

La mannitol déshydrogénase est une enzyme présente chez *Leuconostoc*. Elle transfère deux hydrogènes issus de deux molécules de NADH sur une molécule de fructose pour produire du mannitol.

NAD⁺ = Nicotinamide Adénine Dinucléotide, agent d'oxydation ; NADH = agent de réduction ;
MDH = Mannitol DésHydrogénase.

b. Procédé sucrier

L'extraction du saccharose à partir des racines de betteraves se décompose en neuf étapes (voir la figure n°21).

Il débute par le lavage des racines. De la zone de stockage, les racines sont reprises par un chargeur à benne puis déposées sur un tapis qui les conduit jusqu'à un cylindre éboueur (alimentation « à sec »). Elles passent ensuite à travers des épierreurs et esherbeurs, afin de les débarrasser du reste de terre, d'herbes, de sables et de pierres (obus et autres objets extraits des champs). Dans ce circuit, environ 1 m³ d'eau est déversé par tonne de betterave, en sens inverse de l'arrivée des racines. L'eau terreuse est ensuite stockée dans des bassins de décantation, avant épandage. Les autres « déchets » sont recyclés par redistribution dans les champs.

Les racines arrivent ensuite aux coupes-racines. Ce sont des appareils équipés de couteaux qui découpent les racines par passages successifs en cossettes faîtières, forme optimale pour l'extraction du sucre par diffusion. L'épaisseur des cossettes varient entre 0,9 mm et 1,3 mm pour une longueur comprise entre 5 et 6 cm (voir la théorie de la diffusion de Fick en [annexe n°5a](#), et le schéma d'une cossette idéale en [annexe n°5b](#)).

Conduites par un tapis, les cossettes arrivent dans des cylindres rotatifs qui assurent l'étape de la diffusion. Une eau chauffée à environ 76°C circule à contre-courant des cossettes. Elle dénature la membrane ectoplasmique des cellules (zone externe du cytoplasme) et provoque alors la diffusion du saccharose contenu dans les vacuoles, soit, son extraction (pH de 5,6). Cette étape dure environ 90 min. Une fois vidées de leur contenu en saccharose, les cossettes sont dénommées pulpes, et récupérées pour être pressées (de 7 % de matière sèche, elles passent à 25 %). Elles sont ensuite stockées ou déshydratées, pour être vendues aux éleveurs sous forme pressées ou de pellets.

Pour revenir sur le jus extrait (jus de diffusion : JD), une neutralisation du pH et une purification sont nécessaires avant l'étape d'évaporation. En effet, le jus est chargé en

impuretés telles que les protéines, les minéraux et les sucres réducteurs notamment, qui forment des particules en suspension et colorent le jus. L'épuration calco-carbonique basée sur les propriétés basique et coagulante de la chaux, permet de purifier le JD en deux étapes : le pré-chaulage et le chaulage. Celles-ci consistent en un ajout de chaux (respectivement, progressif puis massif), suivi d'un apport en dioxyde de carbone, c'est la carbonatation. Lors de cette étape, la chaux hydratée ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) passe sous forme de carbonate de calcium (CaCO_3). Une première carbonatation est conduite après le pré-chaulage (20 min / 80°C / 2,5 g de CaO/L / $\text{pH} \sim 11,15$), et est suivie d'une première filtration pour éliminer le précipité alors formé. Le jus clair 1 est ainsi obtenu (JC1). S'ensuit le chaulage massif (10 min / 90°C / 10-15 g CaO/L / $\text{pH} \sim 12,5$) avec une deuxième carbonatation et une seconde filtration, pour l'obtention du jus clair 2 (JC2). Les boues éliminées du jus formant les précipités sont recyclées en écumes après déssucrage, pour être revendues pour l'épandage.

Une étape de décalcification est prévue afin d'éviter la calcification des tubes des évaporateurs. Les sels de calcium sont remplacés par des sels de sodium par passage du JC2 sur un lit de résines poreuses échangeuses d'ions. La sulfitation est également pratiquée pour décolorer le jus et réduire son alcalinité.

Avant l'étape de la cristallisation, le JC2 doit être concentré. C'est par l'atelier d'évaporation multi-effet, où le jus et la vapeur circulent en parallèle, que l'eau du jus s'évapore grâce à des réglages de pression et de température. Au cours de l'évaporation, des écarts de température et de pression optimisent l'évaporation et déterminent le nombre d'effets nécessaires pour l'obtention d'un sirop d'une pureté avoisinant 94 %. En sucrerie, 4 à 6 effets sont nécessaires. Au cours de l'évaporation, une quantité d'eau importante est générée par la sucrerie (10 000 T de betteraves rejettent environ 7430 m^3 d'eau). Grâce à une optimisation de l'utilisation de l'énergie, qui se traduit notamment par le recyclage de l'eau pour l'alimentation des chaudières et la production d'une vapeur haute pression pour l'énergie utile, les sucreries sont quasiment autonomes (un débit de vapeur de 70 T/h qui passe de 42 à 2,5 bar permet de produire 10 MW).

Après l'obtention d'un sirop sursaturé, il faut extraire et purifier le saccharose, c'est l'étape de la cristallisation. Elle s'effectue en trois jets, chaque jet comprenant trois étapes : la cuisson, le malaxage et l'essorage. Au cours de la cuisson (80°C), il y a formation de cristaux en suspension par l'ensemencement de fins cristaux, c'est le grainage. Grâce au malaxage, il y a obtention d'une masse cuite (MC1), où le saccharose est cristallisé ; et par essorage de celle-ci, il y a une séparation des cristaux de sucre (SC1), et du sirop restant, appelé « égout pauvre » (EP1). Avant le séchage du SC1, la surface des cristaux est lavée, c'est le clairçage. Le sirop issu de ce lavage est appelé « égout riche » (ER1). Au fur et à mesure des jets, la pureté diminue, et à chaque type de produit est ajouté le numéro de jet correspondant.

A l'issue des trois jets, la mélasse est obtenue, aussi appelée sirop basse pureté (SBP) où sont concentrées toutes les impuretés (minéraux et sucres invertis notamment). Celle-ci est recyclée en distillerie pour la production d'alcool par fermentation (1 T de betterave produit de 90 à 100 L d'alcool en moyenne).

Avant son stockage, le sirop doit être séché car il est entouré d'une pellicule de sirop saturé. Sa teneur en eau doit être ramenée à environ 0,1 % pour qu'il conserve sa forme cristalline. Des sécheurs à tambours sont le plus souvent utilisés. De l'air chaud (50°C) circule dans le même sens que le sucre, et de l'air froid en contre-sens.

Après cette étape de séchage, un temps de maturation est prévu afin de permettre à l'état de cristal de se stabiliser (équilibre air/sucre : teneur en eau du sucre de 0,03 à 0,04 % pour une humidité relative de l'atmosphère de 60 à 65 %). Le sucre blanc est finalement stocké dans des silos verticaux d'une capacité d'environ 10 000 T, avec air et humidité contrôlés.

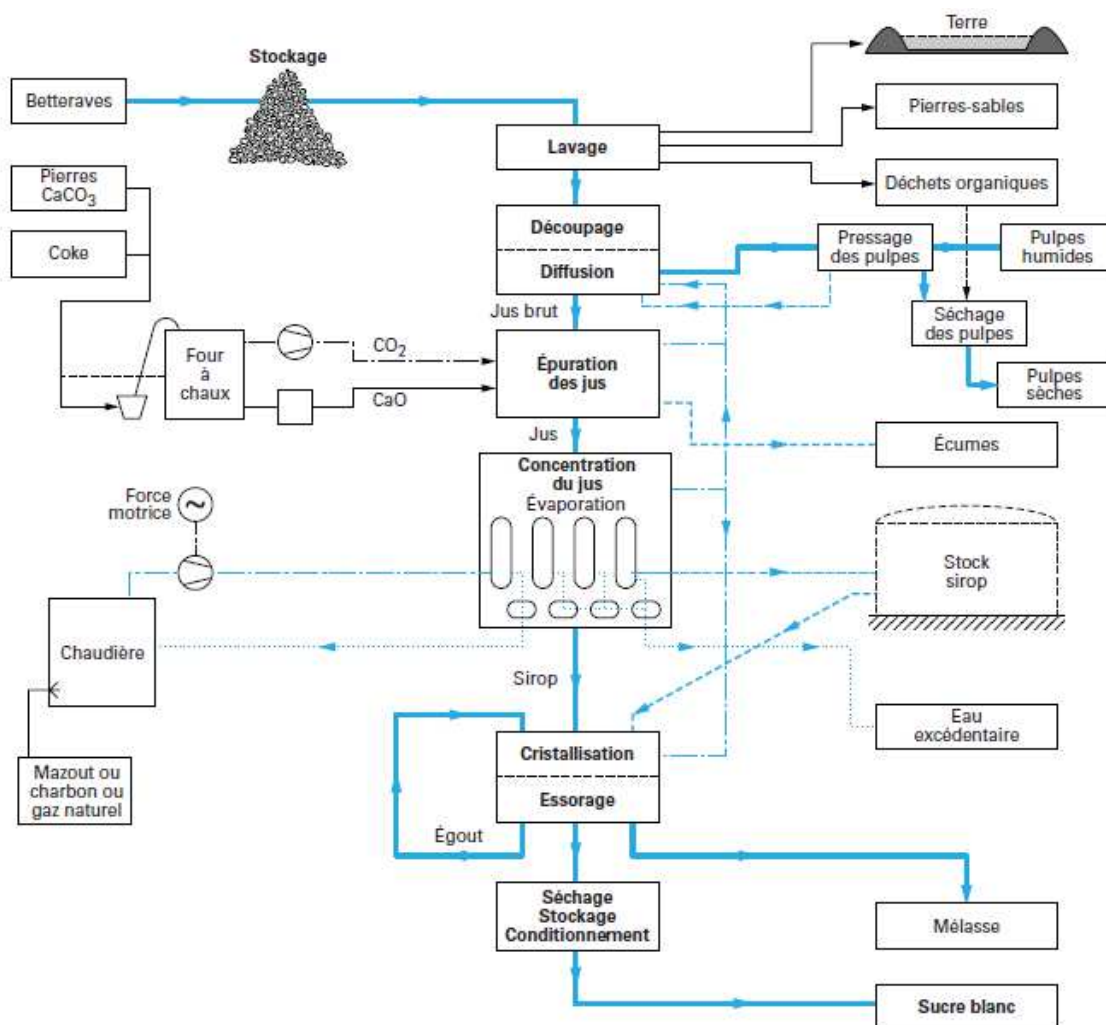


Figure n°21 : Procédé de transformation du sucre extrait des racines de betteraves
[Decloux, 2002].

Des essais de conservation ont été mis en place depuis 2003, mais le lien avec le procédé industriel était rarement fait, si ce n'est inexistant. La thèse est la continuité de ces essais, avec un réel échange entre les mondes agronomique et industriel. Elle offre l'accès à des analyses laboratoires plus poussées, l'ouverture sur des pistes innovantes et à des projets menés en adéquation entre les services agronomique et procédé.

Le chapitre 2 présente les changements physiques et biochimiques subis par les racines au cours du stockage.

Le chapitre 3 est dédié aux indicateurs de contaminations. Il met en valeur certains composés organiques produits lors du stockage des racines et liés à la dégradation de la qualité industrielle.

Et le chapitre 4 est consacré à l'introduction des travaux initiés dans le cadre de la thèse, offrant de nouvelles perspectives d'étude.

Chapitre 2 : Changements physiologiques au cours du stockage

1) Matériels et Méthodes

a. Échantillonnage

Deux types d'essais ont été mis en place afin de comprendre les changements physiques et biochimiques des racines au cours du stockage.

L'essai conservation/variétés permet de comparer le comportement de différentes variétés et offre une panoplie d'analyses laboratoire.

L'essai conservation longue durée d'Origny (CLD d'Origny) permet un suivi décadaire de l'évolution des changements au cours du stockage, avec une optimisation de la mesure des pertes de poids ; et une comparaison entre des arrachages manuel, classique et agressif.

i. Silos conservation/variétés

Afin d'étudier les changements physiologiques des racines au cours du stockage, des silos grandeur nature ont été mis en place. Des conditions réelles étaient privilégiées afin d'évaluer au mieux les transformations autant physiques que biochimiques des racines, mais aussi afin de suivre l'évolution de l'ambiance des silos au cours du temps.

❖ Mise en place

Sur deux années consécutives, des silos d'environ 500 tonnes ont été constitués sur deux sites industriels : Lillers (Nord-Pas-de-Calais) et Origny-Sainte-Benoîte (Aisne). Les récoltes ont eu lieu mi-octobre. Les arracheuses sont des automotrices qui permettent de déverser l'intégralité du contenu de leur trémie (les autres types d'arracheuses sont des intégrales qui ne disposent pas forcément de fonds mouvants, assurant la vidange complète, indispensable dans cet essai afin d'éviter les mélanges entre les variétés). Trois parcelles de 150 m² par variété ont été prévues pour trois répétitions biologiques (voir annexe n°6). En 2015/2016, 5 variétés ont été étudiées ; en 2016/2017, 3 variétés ont été sélectionnées suite aux résultats de l'année 1 (élimination des variétés aux comportements intermédiaires).

Une fois l'arrachage d'une parcelle effectué, le tapis de vidange déverse les racines au sol de façon à confectionner les sacs. Préalablement, un arrachage manuel des parcelles a été effectué (la modalité arrachage a été testée dans cet essai). Les racines sont extraites du sol à l'aide de fourche à deux dents, et le collet est légèrement scalpé, selon les recommandations Tereos (cf. figure n°10). Des sacs de 25 racines sont alors confectionnés, en faisant attention à sélectionner des racines de tailles homogènes et attendues (environ 25 cm de long), de forme conique. Les sacs sont ensuite transportés sur les sites industriels et pesés avant la mise en silo.

Dans un premier temps, un lit de racine d'environ 80 cm de hauteur, 50 m de long et 10 m de large est constitué (7 ha d'une variété ont été semés sur chacun des sites, dans le but de constituer les silos). Les sacs sont répartis au cœur du silo de façon à ce que chaque répétition biologique de chaque variété soit influencée de la même manière dans le silo (voir les figures n°22 et n°23). Puis ils sont recouverts du restant des racines, pour un silo d'une hauteur finale d'environ 2 m.

Les enlèvements sont ensuite programmés en fonction d'un cumul de degrés jours intérieur silo ($^{\circ}\text{j int}$). Les températures sont suivies grâce à la mise en place de deux sondes, positionnées de part et d'autre du silo (extrémités droite et gauche d'une même longueur de silo), au niveau du cœur de silo (à la hauteur des sacs). Le protocole de mise en place des silos est disponible en [annexe n°6](#).

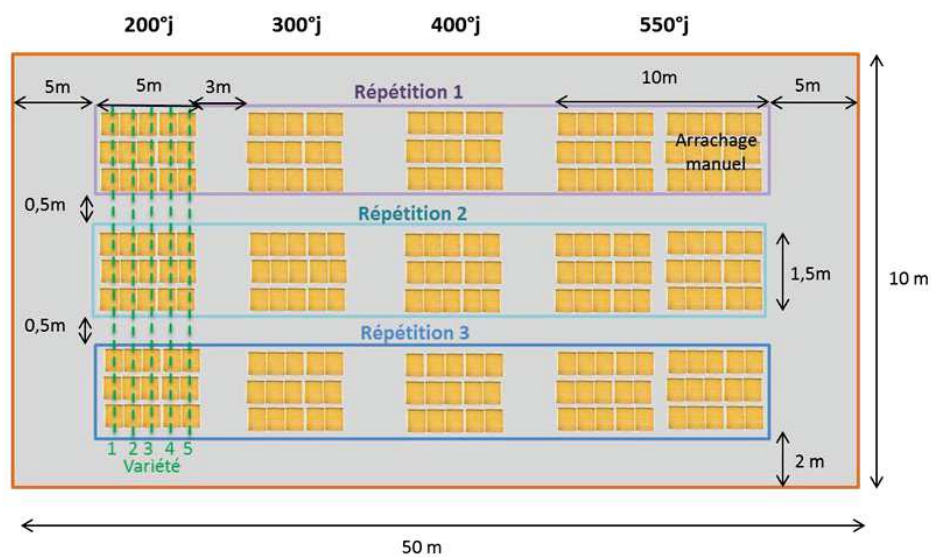


Figure n°22 : Vue du dessus d'un silo conservation/variété, avant recouvrement.

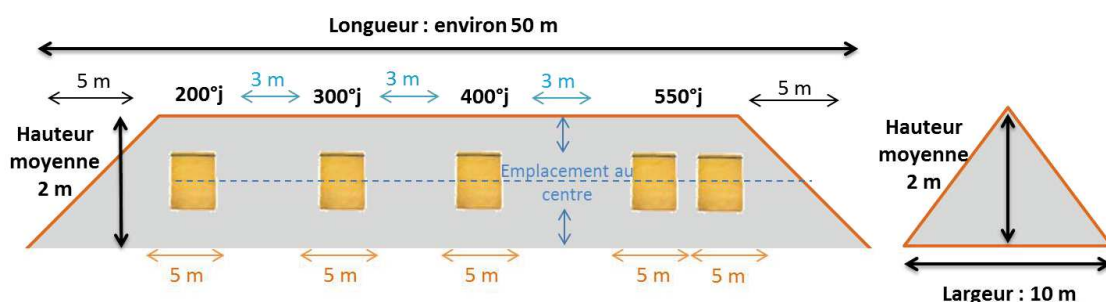


Figure n°23 : Vues en longueur et de face d'un silo conservation/variété.

❖ Suivi

À leur sortie, les sacs sont pesés afin d'évaluer leur variation de poids (perte ou gain en eau). Cette donnée est essentielle afin d'évaluer les pertes en sucre et les pertes de matière sèche pour chaque sortie de silo (voir les équations 7, 8 et 9, où « s » symbolise le moment de sortie de silo).

$$7) \text{ Variation de poids à "s" (\%)} = \frac{(\text{Poids "s"} - \text{Poids initial})}{\text{Poids initial}}$$

$$8) \text{ Perte en sucre à "s"} = \text{Sucre initial} - ((1 + \text{variation de poids}) * \text{Sucre "s"})$$

$$9) \text{ Perte de MS à "s"} = \text{MS initiale} - ((1 + \text{variation de poids}) * \text{MS "s"})$$

Cette mesure est délicate car elle est dépendante des conditions météorologiques des jours de récolte et de sortie de silo. Si le jour de récolte est pluvieux, la boue enrobe les racines (seul un nettoyage superficiel a pu être pratiqué), et de la terre est pesée lors de la mesure initiale. Pendant le stockage, cette terre sèche et se décolle des racines, créant un biais par rapport à la mesure initiale (pertes plus importantes que les pertes réelles).

Ce problème a été rencontré en année 2, pour le site de Lillers notamment. Les conditions de récolte ont été laborieuses, et des écarts anormaux entre les poids initiaux et les poids finaux ont été observés. Les données aberrantes ont été éliminées suivant la méthode statistique détaillée plus loin.

Le cumul des températures est relevé pour chaque prélèvement. Grâce au transmetteur, les données sont transférées sur l'ordinateur, et les mesures des deux sondes sont accessibles. Pour chaque jour, la moyenne des températures des deux sondes est effectuée pour déterminer le cumul moyen des températures du silo, correspondant à chaque prélèvement.

❖ Mesures

Les sacs sont ensuite transférés dans les laboratoires agronomiques. Des mesures physiques sont tout d'abord réalisées sur racines entières. Les racines sont ensuite transformées en râpures pour le reste des analyses ; ou encore transformées en jus pour l'évaluation de la qualité industrielle. Une râpure est la résultante du râpage de 50 racines (soit une répétition biologique). Avec une râpure, environ 10 barquettes sont confectionnées (1 barquette représente environ 40 g de râpure). Ces barquettes sont ensuite réparties vers les différentes analyses.

Sur les 2 années, les facteurs lieu (Lillers et Origny), variété (5 ou 3 géotypes), durée (de 250°j à 615°j ou 730°j int), arrachage (manuel ou mécanique) et répétitions biologiques (3 parcelles de la même variété dans un champ) ont été évalués.

En année 1, la modalité conditionnement a également été testée. Il s'agissait de comparer un stockage idéal à un stockage réel, soit un stockage en chambre climatisée de racines arrachées manuellement, en conditions contrôlées : 8°C et 95 % d'humidité ; comparé à un stockage en silo de racines arrachées mécaniquement. En année 1, le facteur arrachage n'a été évalué qu'en fin de stockage avec la modalité croisée : chambre/arrachage mécanique et silo/arrachage manuel.

Ces essais ont été menés en partenariat avec un sélectionneur. Ce dernier souhaitait tester la condition idéale puisqu'elle correspond à leur condition de sélection variétale, et la comparer à la condition réelle des agriculteurs. Ceci dans le but de vérifier si leurs conditions expérimentales sont représentatives, et que leurs recommandations variétales sont justifiées d'un point de vue terrain.

En raison de résultats non-concluants sur la partie stockage en chambre (pertes en sucre anormales et développement de pourriture inattendu, notamment), il a été décidé de supprimer le stockage en chambre en année 2. Cependant, il est intéressant de disposer de résultats sur les deux types d'arrachage (manuel et mécanique), afin de comparer l'évolution d'une racine saine/non blessée, à celle d'une racine contaminée/blessée. Des racines arrachées mécaniquement et manuellement ont donc été disposées en silo pour chaque date de sortie de l'année 2.

S'agissant des analyses effectuées après l'enlèvement des sacs, la répartition avec le partenaire et les prestataires extérieurs s'est faite comme mentionnée dans le tableau n°3. À préciser que des analyses microbiologiques et métaboliques ont également été menées ; leurs résultats sont présentés en fin de document, dans le chapitre 4.

En charge	Analyses physiques	Analyses biochimiques	Analyses microbiologiques
Tereos	Indice de pourriture (année 2)	Saccharose, hexoses, autres sucres et bétanine Qualité industrielle	
Semencier partenaire	Marc	Richesse Matière sèche	q-PCR Séquençage
Partenaire	Indice de pourriture (année 1) Résistance physique		
Partenaire	Fibres		
Partenaire		Activités enzymatiques	

Tableau n°3: Répartition des analyses entre les partenaires du projet conservation/variétés.

La sélection des variétés a été faite par le partenaire sélectionneur pour quatre d'entre elles ; Tereos en a sélectionné une, la V3. Le choix de Tereos a été fait en fonction du rendement de la variété ; le choix du partenaire s'est porté sur des caractéristiques physiques, comme décrit dans le tableau n°4.

Noms	Identifications	Performance aux essais pénétrométriques	Résistance au pourrissement
V1	Tolérante Rhizomanie	Très mauvais	Très faible
V2	Tolérante Rhizomanie, Rhizoctone brun et à la montée à graines	Très bon	Très bon
V3	Tolérante Rhizomanie Richesse	Bon	Intermédiaire
V4	Tolérante Rhizomanie et à la montée à graines	Mauvais	Relativement faible
V5	Tolérante Rhizomanie, Nématodes et à la montée à graines	Intermédiaire	Très bon

Tableau n°4 : Caractéristiques des variétés sélectionnées.

ii. Silo conservation longue durée d'Origny (CLD d'Origny)

Chaque année, le service agronomique de Tereos organise un essai conservation longue durée afin de disposer d'une référence pour la campagne en cours. De ce fait, en fonction des conditions météorologiques, le service dispose d'un suivi de l'ambiance d'un silo au cours du stockage. L'essai mis en place pendant la campagne 2016/2017 a été exploité dans le cadre de la thèse.

❖ Mise en place

Cet essai est organisé sur le site d'Origny-Sainte-Benoîte, à proximité de la cour de stockage des betteraves (alimentation de l'usine). Le silo représente environ 300 tonnes. 137 sacs de 25 racines d'une même variété y sont disposés (même procédure que pour les essais conservation/variétés). Huit sorties sont organisées (environ tous les 10 jours, jusqu'à fin janvier (25/01/2017)).

Ici, les modalités arrachage agressif et chaulage (en plus des arrachages classique et manuel) sont testées. Pour ce faire, la récolte de la parcelle est organisée en trois temps.

Tout d'abord un arrachage manuel (10 sacs : 5 pour un stockage de 4 semaine après récolte ; 5 en semaine 8). Celui-ci est fait directement au champ, et les sacs sont ensuite stockés sur la cour de stockage de l'usine (1 journée avant la constitution du silo).

Puis l'arrachage mécanique classique. La machine est réglée pour une vitesse de déplacement moyenne, et des réglages du système de nettoyage adaptés au terrain afin d'éliminer suffisamment de terre sans blesser les racines. L'arracheuse récolte environ 2500 racines, soit 250 m² (100 000 racines/ha) pour pouvoir constituer 88 sacs. Le tas de racines est chargé dans une remorque et transporté dans la cour de stockage (les sacs seront faits le lendemain, au moment de la constitution du silo).

Et en dernier lieu, l'arrachage mécanique agressif. Ici, les réglages machines sont revus : rythme d'avancement accéléré, réglages du système de nettoyage rapide, de façon à engendrer plus de chocs sur les racines, donc davantage de blessures. 28 sacs sont prévus, soit 700 racines (70 m²), 5 sacs par semaine (sauf pour la dernière semaine où 8 sacs sont prévus).

L'aspersion à la chaux a été effectuée sur des racines arrachées de façon classique, au moment de la mise en place des sacs sur le silo. 24 sacs ont été prévus, 4 sacs par semaine, à partir de la semaine 4 (sauf pour la dernière semaine, où le nombre de sacs est doublé).

❖ Mesures

Les mesures prévues à chaque sortie sont la variation de poids des sacs, le taux de pourriture, la richesse et les pertes en sucre. Dans le cadre de la thèse, des analyses HPLC ont également été conduites. Trois sacs par modalité, de la semaine 1 à 8, ont été analysés par HPLC. Pour la modalité chaulage, seules les semaines 4, 6 et 8 ont fait l'objet d'analyses HPLC. La correspondance entre les semaines de sortie et le cumul de °j int atteint est récapitulé dans le tableau n°5.

Dans cet essai, afin de pallier les imprécisions de la mesure de variation de poids dues à la terre, les racines sont lavées avant la mise en sac et la pesée initiale. À leur sortie de silo, les racines sont de nouveau lavées, avant la pesée finale. L'absence de terre permet alors d'obtenir des mesures plus précises des variations de poids des sacs que dans le cadre de l'essai conservation/variétés.

Ces manipulations sont possibles ici grâce à la proximité de l'atelier agronomique. Les racines sont disposées sur un tapis, puis acheminées vers un lavoir. Une fois lavées, elles sont pesées, puis réparties entre la râpe, pour les analyses biochimiques, et l'épluchage, pour l'évaluation du taux de pourriture.

Semaines de sortie des sacs	Cumul de température (°j int)
1	68
2	182
3	212
4	265
5	314
6	347
7	382
8	406

Tableau n°5 : Correspondance entre les semaines de sorties des sacs de l'essai CLD d'Origny et les cumuls de température atteints à chaque sortie.

b) Analyses physiques

i. Développement de pourriture : Indice et taux de pourriture

❖ Indice de pourriture (IP)

L'équipe agronomique de Tereos se base sur l'indice de pourriture, ou encore le taux de pourriture, pour évaluer le développement de maladies en silo. Il s'agit de l'évaluation visuelle de l'étendue de la pourriture sur les racines par des opérateurs formés.

Dans l'essai conservation/variétés, l'IP a été évalué selon une échelle à sept classes en année 1, par le partenaire (voir le tableau n°6a). En année 2, Tereos a réalisé cette évaluation avec une échelle à 12 classes (voir le tableau n°6b et la figure n°24). Avec l'expérience de la première année, des ajustements ont été adoptés pour une analyse plus fine en deuxième année :

- Grille de notation plus précise ;
- Mêmes opérateurs pour chaque sortie ;
- Découpe des racines pour une meilleure évaluation de l'ampleur de la pourriture.

En fonction de l'étendue de la pourriture sur la surface des racines et de sa profondeur, un indice est attribué. La différence est faite entre les zones contaminées et les marques de cicatrisation. En cas de cicatrisation, des marques superficielles, brunâtres voire noires, sont observées et non comptabilisées ici.

Pour une variété, trois répétitions biologiques sont évaluées (soit 150 racines). L'IP est calculé comme écrit dans l'équation 10.

$$10) IP \text{ variété} = \frac{\sum(IP * Nb \text{ de racines de la classe})}{Nb \text{ total de racines de la variété}}$$

État sanitaire des racines	Saines		Intermédiaires		Malades		
	0%	0-10%	10-25%	25-50%	50-75%	75-100%	100%
Taux de pourriture							
Indice de pourriture correspondant	0	1	2	4	6	8	10
Référence échantillon : Nombre de racine/classe							

a) Échelle de l'année 1 (Tableau n°6)

État sanitaire des racines	Saines			Intermédiaires			Malades					
	0	0-5	5-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
Taux de pourriture (%)												
Indice de pourriture correspondant	0	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Référence échantillon : Nombre de racine/classe												

b) Échelle de l'année 2

Tableaux n°6 : Échelles d'évaluation des indices de pourriture.

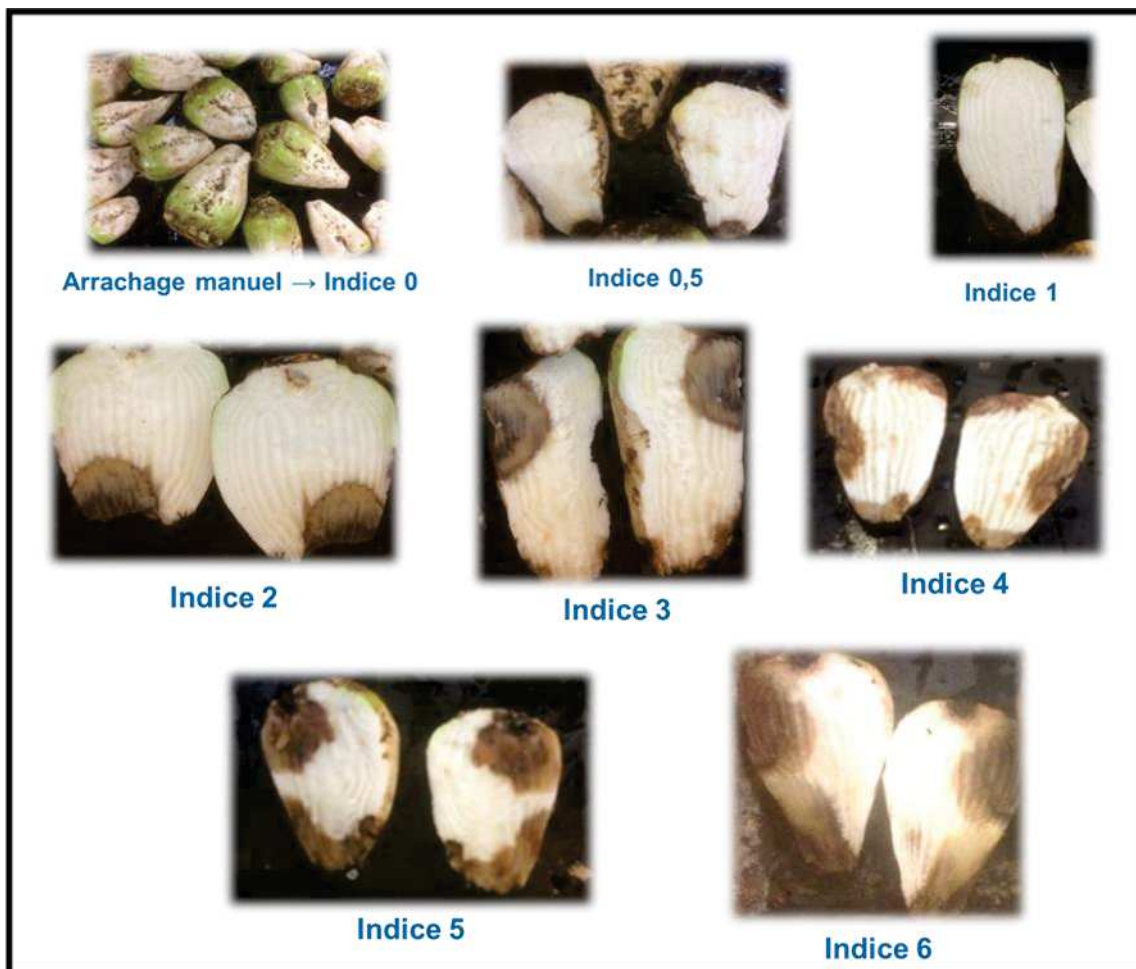


Figure n°24 : Photos illustrant les différents indices de pourriture (essai conservation variétés 2016/2017).

❖ Taux de pourriture

Après la pesée des 25 racines lavées de l'essai CLD d'Origny, 15 racines sont utilisées pour évaluer le taux de pourriture. Les 10 autres racines sont envoyées à la râpe.

L'évaluation du taux de pourriture consiste en l'épluchage des parties pourries des racines. Les opérateurs préalablement formés, découpent les morceaux contaminés des racines, à différencier des traces noires de cicatrisation.

Une fois les 15 racines épluchées, les parties pourries sont pesées, et le taux de pourriture est calculé comme écrit dans l'équation 11.

$$11) \text{ Taux de pourriture (\%)} = \left(\frac{\text{Poids des parties pourries}}{\text{Poids initial des 15 racines}} \right) * 100$$

La correspondance entre les IP et les taux de pourriture est consultable en [annexe n°7](#).

ii. Résistance physique

La fermeté de l'épiderme des racines pourrait être un avantage pour la conservation en silo. Un épiderme résistant, difficile à pénétrer, limiterait les contaminations microbiologiques.

Des différences de fermeté et de résistance au pourrissement ont été observées entre variétés par le partenaire dans des études internes. L'idée est ici de vérifier cette observation en conditions réelles (stockage silo de longue durée et arrachage mécanique).

Développée par le partenaire, c'est la technique de la pénétrométrie qui a été employée ici. En [annexe n°8](#), une photo de l'appareil est disponible.

La méthode consiste à mesurer la fermeté des racines. L'appareil utilisé est un Penefel automatique (de SETOP, Rte du Moulin de Losque, Cavaillon, France - www.setop.fr) couramment utilisé sur les fruits croquants (pommes, poires, pêches). Ce texturomètre mesure avec précision la force maximum de pénétration d'un embout normalisé (diamètre de 0,36 cm) grâce à son capteur de force électronique. Cette force est exprimée en kg/cm². Plus la force de pénétration est importante et plus ferme est le produit testé. L'appareil est portable, il permet des mesures rapides (240 racines / h / 2 opérateurs) sans influence de l'opérateur grâce à sa motorisation à vitesse constante. Les mesures sont déclenchées au pied (pédale).

La mesure a été répétée 3 fois sur chaque racine lavée (3 cm en dessous du collet) de façon à s'assurer de la répétabilité de la mesure. Comme pour l'IP, des améliorations en année 2 ont été apportées ; ici, au niveau de l'échantillonnage. En année 1, 12 racines / répétition ont été testées pour chaque sortie ; 30 racines par répétition en année 2, les jours de récolte et de fin de stockage (soit respectivement 36 et 90 racines / variété / sortie / modalité).

iii. Marc

Il s'agit de la fraction insoluble des racines. Il se compose des fibres (cellulose, hémicellulose et lignine) et des pectines. L'objectif ici est d'approfondir les connaissances sur les changements physiologiques au cours du stockage, et de faire le lien avec la résistance physique.

En année 1, c'est un marc calculé (voir l'équation 12).

$$12) \text{ Marc } \left(\frac{g}{100 g} \right) = \text{ Matière sèche } \left(\frac{g}{100 g} \right) - \text{ Saccharose } \left(\frac{g}{100 g} \right)$$

En raison de l'imprécision de cette mesure (présence d'autres sucres), c'est la méthode officielle de l'institut néerlandais de la betterave (IRS) qui a été employée en année 2 (voir l'équation 13).

Le protocole indique que l'échantillon de râpures doit être tout d'abord pesé (**A**), puis mis en solution dans de l'eau déminéralisée à 60°C avec un agitateur dans un bécher. Laisser reposer 5 minutes. Verser ensuite le surnageant à travers un filtre muni de laine de coton, tous deux préalablement séchés et pesés (respectivement **B** et **C**). Répéter cette manipulation 3 fois. La 3^{ème} fois, l'intégralité de l'échantillon doit être déversée à travers le filtre.

Un 4^{ème} et 5^{ème} lavage sont effectués afin d'extraire l'intégralité de l'échantillon du bécher dans le filtre. Et ensuite, verser 100 mL d'eau déminéralisée à 80°C pour laver l'échantillon présent dans le filtre.

Finalement, amener l'échantillon aussi bas que possible en rinçant les côtés du filtre avec de l'eau déminéralisée. Verser 35 mL d'éthanol sur le filtre. Récupérer l'échantillon et le placer toute une nuit dans le four à 105°C. Peser l'échantillon à sa sortie du four **(D)**.

Le placer ensuite au four à moufle pendant 1h30 à 550°C. Après passage au four à moufle, seuls les minéraux restent. Cette fraction est également pesée **(E)**.

$$13) \text{ Marc } \left(\frac{g}{100 g} \right) = \frac{(\text{poids fraction insoluble} - \text{poids des cendres})}{\text{poids de la râpüre}} * 100$$

Soit : **Marc (g) = (D – B – C – E) / A**

iv. Fibres

Dans le but d'approfondir les connaissances sur la composition du marc des racines, l'idée est ici de déterminer les proportions de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. La méthode employée a été celle de Van Soest [Van Soest and Robertson, 1979].

Elle consiste en l'utilisation de détergents neutres, acides puis d'acide sulfurique (voir protocole [en annexe n°9](#)). Par une série d'étapes de digestion, de centrifugation et de lavage, on obtient tout d'abord la fraction hémicellulose + cellulose + lignine (NDS), puis cellulose + lignine (ADS), et enfin lignine (ADC).

Par de rapides calculs, on obtient ainsi les fractions de chacune des fibres :

- Hémicellulose = NDS – ADS
- Cellulose = ADS – ADC
- Lignine = ADC

Au fur et à mesure des étapes, il y a une perte de précision de la mesure. En effet, les étapes de lavage et de centrifugation peuvent subir une perte de matière, avec des prélèvements effectués par des opérateurs (facteur humain qui s'additionne à chaque étape). La mesure d'hémicellulose est alors plus précise que la mesure de cellulose, elle-même plus précise que la mesure de lignine.

Pour davantage de représentativité et robustesse des résultats, ce sont les résultats de fibres totales qui ont été exploités. Les résultats d'hémicellulose sont également présentés, en raison de données exploitables (tests statistiques).

En année 1, les mesures n'ont été prises que le jour de la récolte (J0). En année 2, les mesures ont été faites à J0 et en fin de stockage.

Deux mesures par échantillons ont été faites. De ce fait, le résultat attribué à un échantillon est la moyenne de deux mesures.

v. Pectines

Comme vu dans la bibliographie, les pectines peuvent former un gel, gênant en process sucrier. C'est une valeur estimée par le calcul suivant qui a été utilisée :

$$14) \text{ Pectines } \left(\frac{g}{100 g} \right) \sim \text{Marc } \left(\frac{g}{100 g} \right) - \text{Fibres } \left(\frac{g}{100 g} \right)$$

c. Analyses biochimiques

i. Richesse (polarimètre)

Le polarimètre est la méthode de référence pour mesurer la richesse d'un échantillon de râpure ; c'est-à-dire sa concentration en saccharose. Il est aussi appelé saccharimètre.

Le principe du polarimètre repose sur la déviation de la lumière par les molécules disposant d'un pouvoir rotatoire (voir la figure n°25). Le saccharose est dextrogyre, il dévie la lumière vers la droite ($\alpha = +66,45^\circ$).

Un polarimètre est équipé d'une source de lumière qui émet un faisceau lumineux. Ce faisceau est canalisé par une lentille convergente qui oriente le faisceau parallèlement au plan de polarisation. Puis le passage à travers un polariseur permet d'orienter le faisceau dans une direction unique. En traversant l'échantillon de jus de racine, le faisceau est dévié. Un analyseur mesure l'angle de rotation, et ainsi la concentration de la substance optiquement active est mesurée. C'est la loi de Biot qui est utilisée (voir l'équation 15).

$$15) \alpha = [\alpha]_{\lambda, T} * l * C$$

Où :

- α : angle de rotation mesuré (degré)
- $[\alpha]$: angle de rotation spécifique dépendant de la longueur d'onde de la lumière (λ , généralement celle du sodium) et de la température (T, généralement 20°C) ($^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$)
- l : longueur de la cuve traversée par la source lumineuse (dm)
- C : concentration de l'échantillon ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

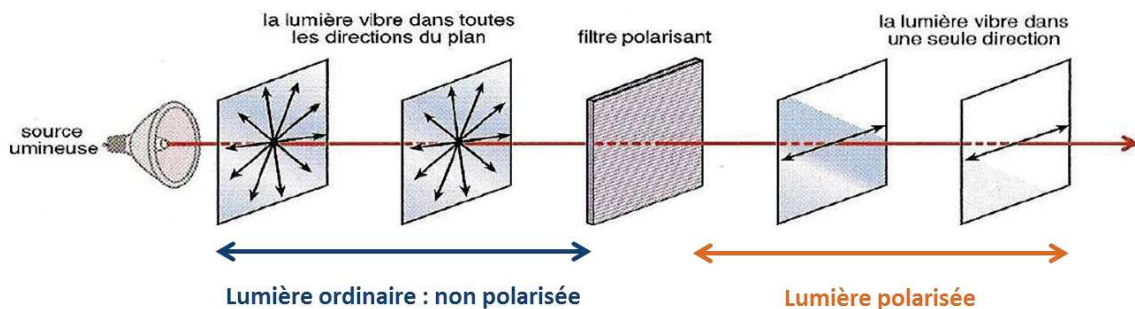


Figure n°25 : Principe de fonctionnement d'un polarimètre [INSA Rouen, 2014].

Pour l'extraction des jus de racines, une chaîne Gallois est utilisée (photo disponible en annexe n°10a et n°10b).

Elle débute par la pesée de l'échantillon de râpüre (+/- 40 g) à l'aide d'une balance proportionneuse. Celle-ci délivre la juste quantité d'aluminium sulfate nécessaire à la digestion (facteur de dilution de 4,71 ; concentration à 4,6 g/L).

La râpüre pesée ainsi que l'aluminium sulfate sont déversés dans un pot muni d'un agitateur. 5 minutes de digestion sous agitation sont prévues (acheminement automatique des échantillons de la balance au polarimètre). Suite à ces 5 minutes, le contenu du pot est déversé (automatiquement) dans un filtre placé au-dessus d'un bécher. 6 minutes de filtration sont programmées.

À l'issue de l'étape de filtration, le filtrat est collecté et déversé dans l'entonnoir de la chaîne d'analyse multi-cassettes (1, voir la figure n°26).

Le jus va s'écouler dans la cuve de mesure du saccharimètre (2) puis dans la cuve du préleveur (3). Lorsque l'entonnoir est vidé et que la mesure du saccharimètre est stabilisée, un bouton permet de donner l'autorisation au logiciel INFOLAB d'effectuer l'analyse (7). Le logiciel envoie un ordre au passeur (4) qui se positionne en mode prélèvement pendant le temps programmé. L'électrovanne est fermée pendant toute la séquence de prélèvement. Cela permet de verser l'échantillon suivant, sans risque de mélange. La durée de prélèvement écoulée, le passeur repart en position de rinçage jusqu'au tour suivant.

Le jus prélevé est réparti par pompage au niveau du bloc chaîne (5) vers la cassette « photométrie de flamme » pour les mesures de potassium et sodium (6), et vers la cassette dilution (l'excédent est dirigé vers l'égout). Le jus dilué est dirigé vers les cassettes « colorimétries » du bloc chaîne (5) pour les mesures de glucose et d'azote alpha-aminé. Une fois analysé, le jus est re-pompé afin d'assurer une bonne circulation dans les cuves de mesure.

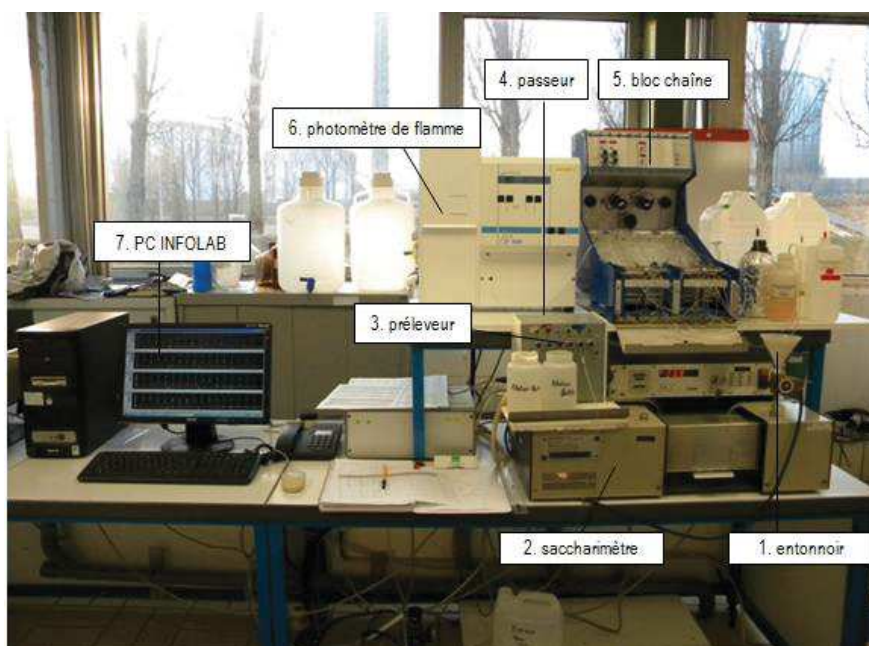


Figure n°26 : Chaîne d'analyse multi-cassettes [Tereos, 2011].

Ici, on considère que seule la molécule de saccharose dévie la lumière. Or, l'échantillon de racine contient également d'autres molécules optiquement actives, comme le glucose et le fructose (respectivement $+ 52,7^\circ$ et $- 92,2^\circ$). Le raffinose également ($\alpha = + 105,2^\circ$). À fortes concentrations, telles qu'on peut les trouver en fin de stockage de longue durée, ces molécules, notamment le glucose (dextrogyre), sont susceptibles de biaiser la mesure du polarimètre. Pour cette raison, il semblait pertinent de comparer les résultats obtenus par polarimétrie à des mesures HPLC.

Il en est de même pour la mesure par colorimétrie du glucose (méthode enzymatique de TRINDER, voir [annexe n°11](#)). Cette méthode a ses limites (saturation et biais éventuellement causés par la présence d'autres molécules), et il semblait intéressant de pouvoir quantifier le glucose de façon plus précise.

ii. Saccharose, hexoses, autres sucres et bétaïne (HPLC)

Pour pallier le biais de la mesure polarimétrique, une méthode HPLC a été mise au point en 2016. Grâce à la chromatographie, chaque composé est mesuré individuellement. La mesure de l'un, n'influence donc pas la mesure de l'autre.

Cette technique est nouvelle pour l'analyse des jus de racines chez Tereos, dans le cadre d'essais conservation longue durée (voir la figure n°27).

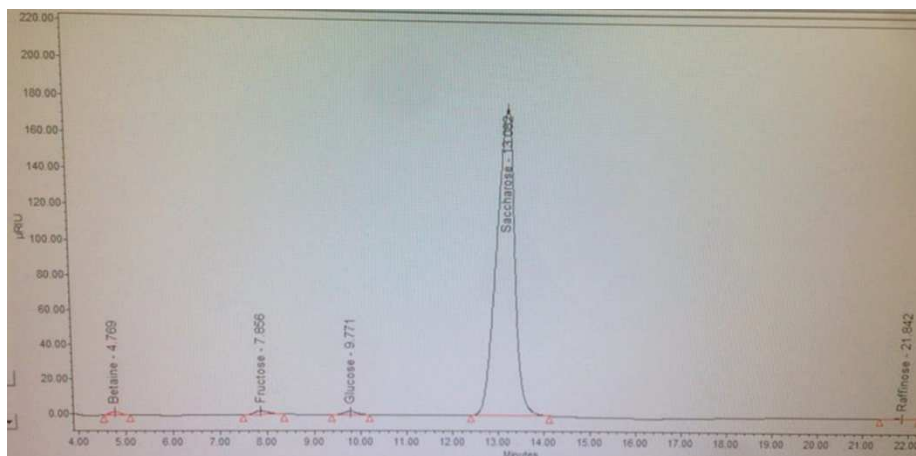


Figure n°27 : Chromatogramme d'un échantillon de betterave en fin de stockage (HPLC-RI) [Tereos, 2017].

La méthode adoptée consiste en l'utilisation d'une chromatographie liquide haute pression (HPLC) équipée d'un détecteur à indice de réfraction.

C'est une colonne Shodex NH2P-40 3E qui a été utilisée pour la séparation des molécules présentes dans les échantillons. C'est une colonne en polyamine (3 mm de diamètre) liée à un gel de polymère hydrophile (4 μm). Elle est adaptée pour la séparation des monosaccharides et oligosaccharides présents en faible quantité, et reste stable au cours des analyses.

L'éluant utilisé est un mélange d'eau (25 %) et d'acétonitrile (75 %). Un flux de 0,350 mL/min est programmé, avec un volume d'échantillon injecté de 5 μL . La colonne et le détecteur sont maintenus à 35 °C.

Le programme HPLC d'une journée est le suivant :

- a) 10 min de conditionnement de la colonne (1 fois par jour) ;
- b) 25 min d'analyse / échantillon ;
- c) 20 min de lavage/rinçage (en fin de journée).

Le rayon lumineux de la lampe traverse une cuve à circulation, séparée diagonalement en cellules échantillon et de référence. Le détecteur mesure la déviation du rayon lumineux provoquée par la différence d'indice de réfraction entre les liquides des cellules échantillon et de référence d'une cuve à circulation simple. À l'arrière de la cuve à circulation, un miroir réfléchit la lumière à travers la cuve à circulation et à travers un verre à dispersion nulle, ce qui modifie la trajectoire du rayon lumineux, vers le récepteur de lumière. Le récepteur de lumière est équipé de deux diodes. Celles-ci produisent un courant électrique proportionnel à la quantité de lumière qui l'atteint, proportionnel donc à la concentration de la molécule (un schéma du principe du détecteur à indice de réfraction est disponible [en annexe n°12](#)).

iii. Matière sèche (MS)

Elle regroupe les fractions insolubles (marc) et solubles de la racine (saccharose, autres sucres et acides organiques).

Elle est estimée par une différence de poids de la râpüre, avant et après son passage au four, à 105°C pendant 72 heures. Une barquette de râpüre (soit environ 40 g de la râpüre de 50 racines) a été analysée par répétition et par modalité (voir l'équation 16).

$$16) MS \left(\frac{g}{100 g} \right) = \left(\frac{\text{Poids râpüre sèche}}{\text{Poids râpüre fraîche}} \right) * 100$$

d) Méthode statistique

Le traitement des bases de données (BDD) a été réalisé avec le logiciel statistique R. Son programme d'analyse a permis de nettoyer les BDD, visualiser leurs distributions, tester les différents facteurs et déterminer des classes, notamment pour les variétés.

Les facteurs étudiés, soit, les variables explicatives, ont été la localisation géographique (effet lieu), le type d'arrachage (manuel, mécanique et mécanique agressif), la durée de stockage (exprimée en cumul de degré jours intérieurs), la variété et les répétitions biologiques.

Les mesures, soit les variables à expliquer, ont été l'indice de pourriture (IP), la résistance physique, le marc, les fibres, le saccharose, les hexoses, la bêtaïne et la matière sèche (MS).

Pour une mesure, 360 données sont enregistrées en année 1 (5 variétés*3 répétitions*2 lieux*2 conditionnements*5 durées de stockage + 2 types d'arrachage en fin de stockage/conditionnement et par lieu (soit 300 + 60)) ; 180 données en année 2 (3 variétés*3 répétitions*2 lieux*2 types d'arrachage*5 durées de stockage).

Parmi ces données, des valeurs atypiques liées à des erreurs d'échantillonnage ou de protocole, de saisie, d'analyse laboratoire ou autres, sont présentes. Ces valeurs nuisent à la représentativité des résultats et à leur interprétation, et doivent être éliminées.

i. Nettoyage des données

C'est une phase exploratoire qui consiste à observer la distribution du jeu de données. Pour chaque mesure, plusieurs facteurs sont considérés ; la variabilité des données est donc dépendante de l'influence des facteurs sur une mesure.

Dans le cadre d'une régression linéaire, des résidus sont calculés (écarts entre les valeurs prédites et celles observées). Les résidus studentisés (centrés/réduits) doivent alors être majoritairement compris entre les bornes +2 et -2, avec environ 5 % des résidus en dehors de ces bornes.

Le test de Grubbs a permis d'identifier les résidus aberrants (valeurs atypiques). Avec un risque α de 5 %, ceux-ci ont été éliminés, tout en opérant avec un œil agronomique (certains résidus identifiés aberrants par le test de Grubbs ont été conservés car la donnée restait pertinente d'un point de vue agronomique ; voir les figures n°28 et n°29).

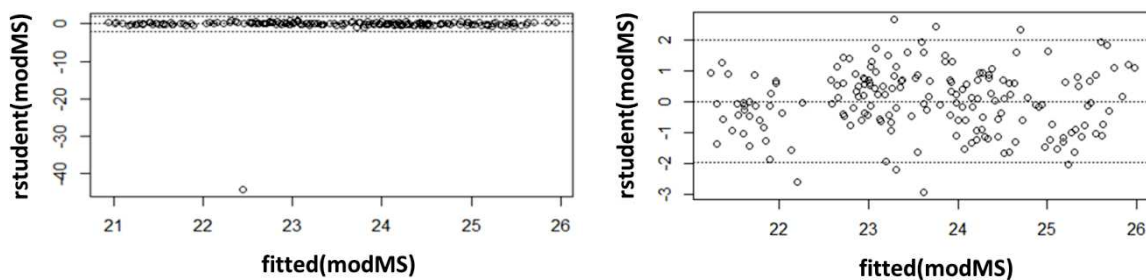


Figure n°28 : Résidus studentisés en fonction des valeurs prédites des mesures de matière sèche.

À gauche : Avant nettoyage.

À droite : Après nettoyage.

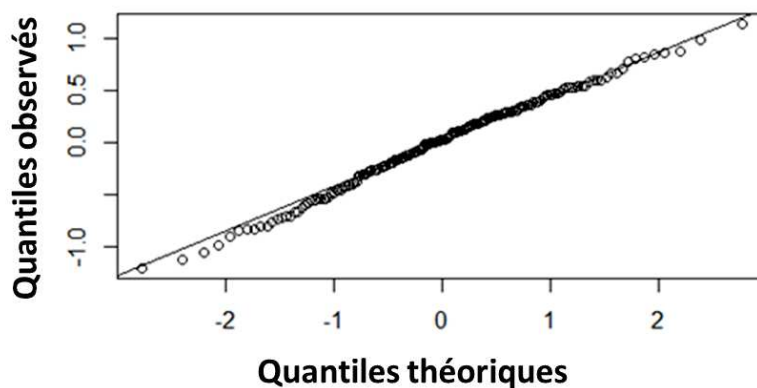


Figure n°29 : Droite de Henry après nettoyage des données "Pertes de matière sèche".

ii. Effets des facteurs et classes des niveaux de facteurs

La normalité de la distribution est tout d'abord testée avec le test de Shapiro-Wilk. Le risque α est maintenu à 5 %.

Si la normalité est vérifiée, l'homoscédasticité (homogénéité des variances) est vérifiée avec le test de Bartlett ; sinon, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est utilisé pour évaluer si les facteurs (variables explicatives) ont un impact significatif sur la mesure.

Si l'homoscédasticité est vérifiée, l'Anova est utilisée pour vérifier l'égalité des moyennes des différentes modalités.

Grâce à la décomposition de la variance, la proportion de variabilité due aux facteurs significatifs est calculée en divisant la somme des carrés des facteurs significatifs par la somme des carrés totale (une illustration de ce calcul est disponible [en annexe n°13](#)).

Exemple : « Le facteur arrachage est responsable de 43 % de la variabilité de la mesure d'indice de pourriture en année 2 ; le facteur durée de 13 %, et l'interaction arrachage/durée de 14 % ».

Pour définir entre quels niveaux d'un facteur identifié comme significatif par l'Anova ou le test de Kruskal-Wallis il y a des différences significatives de moyennes, le test de Tukey est utilisé. Grâce à ce test de comparaisons multiples, les niveaux de facteurs sont assimilés à des lettres (ajoutées sur les graphiques). Deux niveaux de facteur assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents.

Exemple : « Pour une durée de stockage de 500°j int, le facteur variété a un impact significatif sur la mesure d'indice de pourriture. Deux niveaux de ce facteur, V1 et V3 (classe « a »), sont significativement différents de V2 (classe « b »), mais non-différents l'un de l'autre ».

2) Résultats et discussions

A. Les changements physiques

a. Développement de pourriture (IP et taux de pourriture)

i. Essai conservation/variétés

Cette mesure a été incluse dans la partie physique car une corrélation pourrait exister entre la fermeté des racines et leur sensibilité à la pourriture. L'hypothèse initiale repose sur la mise en évidence par le partenaire, de l'existence d'une variabilité génétique exploitable. Les résultats des tests de fermeté (mesures physiques) seraient négativement corrélés aux résultats d'études internes de pourriture après conservation en conditions contrôlées ($R^2 \sim 0,7$). Plus une racine serait ferme, moins elle serait sensible à la pourriture.

Au cours des deux années du projet conservation/variétés, le développement de la pourriture a été mesuré sur les deux sites, sur différentes variétés, à partir de 350°j int en année 1, et 250°j int en année 2. À rappeler que d'une année à l'autre, il y a eu un changement d'échelle de notation de l'IP et d'opérateurs, et des changements des modalités de l'essai. Pour ces raisons, les données des deux années n'ont pas été regroupées.

En arrachage manuel, les racines se conservent jusqu'en fin de stockage sans développement de maladies sur les deux années. Les IP sont donc nuls, du début à la fin du stockage (voir la figure n°24).

En arrachage mécanique, le développement de pourriture est initié à 250°j int (voir la figure n°30). Avec les scalpés et les disques des machines de récolte, les racines arrachées mécaniquement sont blessées, et ces blessures offrent des portes d'entrée aux micro-organismes. S'il y a des contaminations avant la cicatrisation des blessures, il y a développement du pathogène, donc de pourriture, accentué avec la durée de stockage.

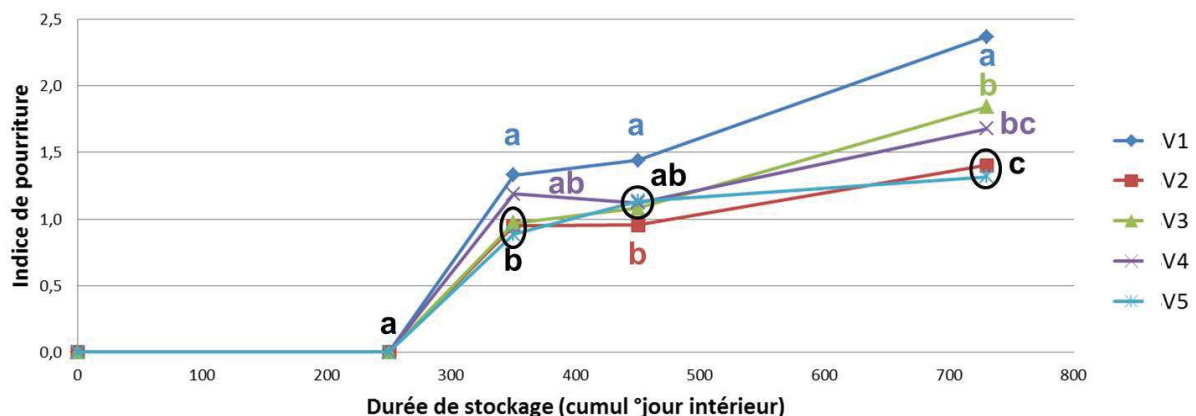


Figure n°30 : Évolution de l'indice de pourriture au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 1 – Arrachage mécanique.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Le développement de la pourriture se fait progressivement au cours du temps, ce qui explique l'effet durée mesuré en analyse statistique. Le développement de pourriture est en moyenne quatre fois plus important à 350°j int qu'à 250°j ; et deux fois plus important en fin de stockage comparé à 350°j int (en année 1, les IP n'ont été évalués qu'à partir d'un cumul de 350°j int, mais il est retrouvé un fort développement de pourriture à 350°j int, et un IP environ deux fois plus important en fin de stockage comparé à 350°j int). Cette évolution suit celle d'une croissance microbologique :

1. La phase de latence, du jour de la récolte à 250°j int ;
2. La phase exponentielle, initiée à 350°j int ;
3. La phase de décélération.

Ces différentes phases semblent dépendantes de la variété (voir la figure n°31).

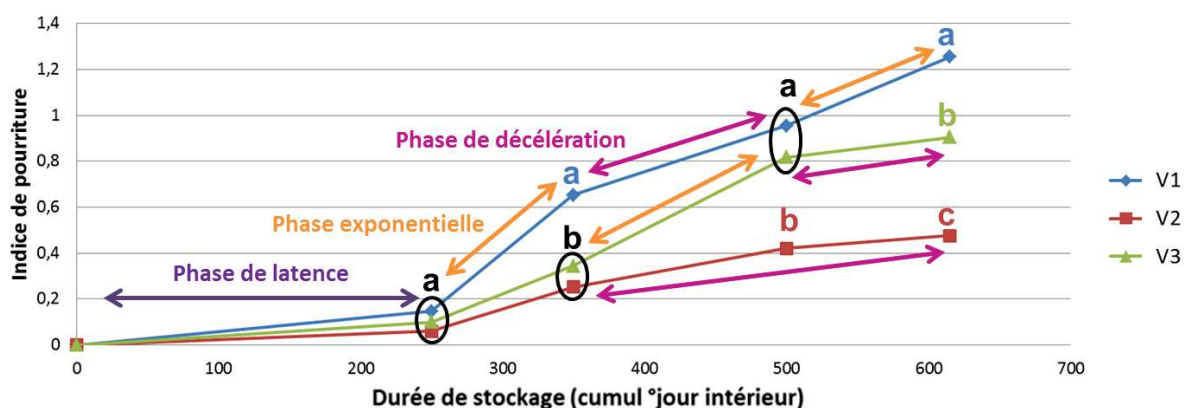


Figure n°31 : Évolution de l'IP au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 2 - Arrachage mécanique.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En effet, sur les deux années, des différences de sensibilité à la pourriture entre les variétés sont observées (cf. le tableau n°4). L'observation des cinétiques d'évolution de la pourriture met en évidence que la variété V1, avec l'indice de pourriture le plus élevé, semble subir une seconde phase de croissance microbologique à partir de 500°j int. V3, variété intermédiaire, semble avoir une phase de croissance exponentielle plus longue que les deux autres variétés en année 2. Au lieu de se terminer à 350°j int comme les deux autres variétés, elle prendrait fin à 500°j. Et V2, avec l'IP le plus faible, a une phase exponentielle de 250°j int à 350°j int, et une phase de décélération qui semble s'initier à 350°j, jusqu'à la fin de stockage.

V4 et V5 n'ont pas été sélectionnées en année 2 pour leurs comportements similaires ou intermédiaires à celui des autres variétés. V4 serait l'intermédiaire entre V3 et V1 ; et V5 entre V3 et V2.

Les différences variétales sont accentuées avec la durée de stockage sur les deux années. Il est observé un changement de classes des différentes variétés au cours du stockage (voir les figures n°30 et n°31). Jusqu'à 250°j int, aucune différence significative n'est observée entre les variétés (phase de latence au niveau microbologique). Jusqu'à 350°j int, on distingue la

variété la plus sensible à la pourriture, V1. Au-delà de 350°j int, les différences variétales s'accroissent avec l'apparition de comportements extrêmes (sensibilité pour V1, et résistance à la pourriture pour V2), et de comportements intermédiaires (V3).

En ce qui concerne le lieu, le développement de pourriture est légèrement plus important sur le site de Lillers en année 1 à plus de 400°j. En moyenne, 21 % de plus comparé au site d'Origny en fin de stockage (voir la figure n°32). À 350°j int, les résultats d'Origny peuvent être liés à une imprécision d'évaluation liée à l'échelle de l'année 1.

En année 2, c'est sur le site d'Origny que le développement de pourriture est le plus élevé. En moyenne, 51 % de pourriture en plus comparé au site de Lillers en fin de stockage (voir la figure n°33).

La différence d'échelle de l'IP entre les deux années (voir les figures n°32 et n°33) met en valeur de meilleures conditions de conservation en année 2, avec un développement de pourriture plus faible. Comme les conditions expérimentales sont sensiblement les mêmes entre les deux années, ce résultat peut s'expliquer par les conditions climatiques, plus propices à la conservation en silo en année 2 : une variation des températures régulière (pas de chocs thermiques) et un climat plus sec, notamment.

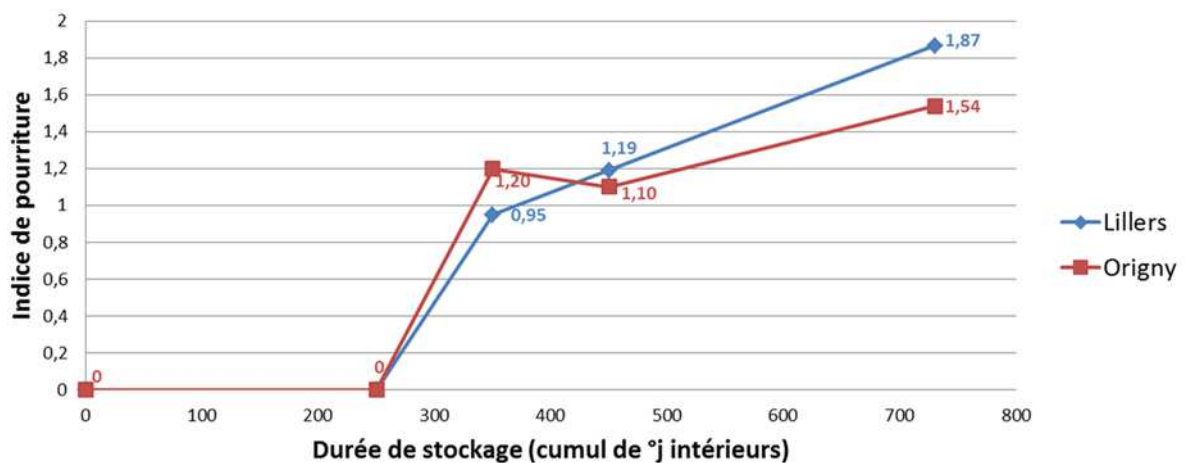


Figure n°32 : Développement de pourriture au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 1.

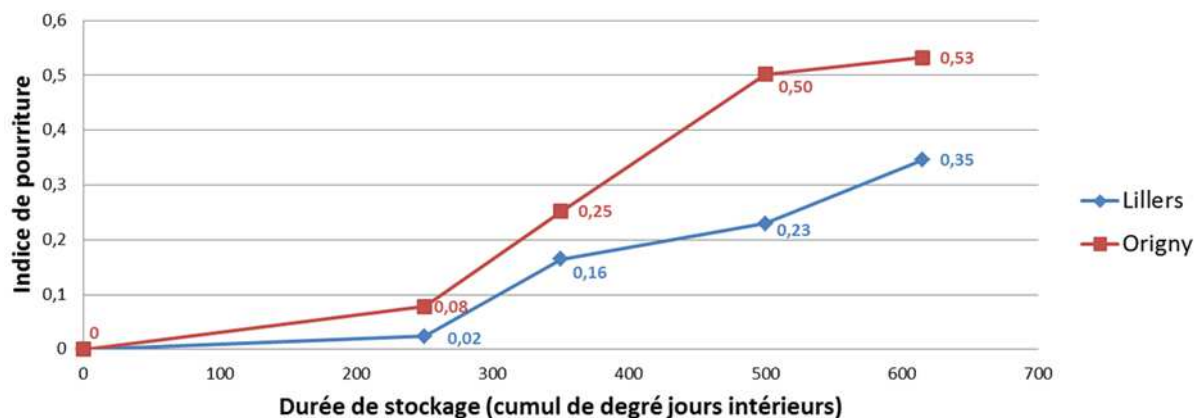


Figure n°33 : Développement de pourriture au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 2.

Suite aux tests statistiques, il apparaît que le facteur arrachage a l'impact prédominant sur la mesure, sur les deux années.

En année 1, il est responsable de 54 % de la variabilité ; ensuite le facteur durée (17 %), le conditionnement (7 %) et les interactions variété/durée (7 %) et lieu/durée (4 %).

Globalement, la comparaison des deux types de conditionnement (chambre et silo) laisse observer que le stockage en conditions réelles (silo et arrachage mécanique) favorise le développement de pourriture (environ cinq fois plus de pourriture en plus qu'avec un arrachage manuel en chambre). Excepté pour la modalité croisée de fin de stockage de l'année 1 (chambre/arrachage mécanique), où la chambre conduit à un IP environ 1,5 fois plus élevé que l'arrachage mécanique en silo. Ce dernier résultat peut s'expliquer par la création d'une ambiance favorable pour les micro-organismes par les conditions de la chambre (8°C et hygrométrie à 95 %).

Les pathogènes s'incrument dans les racines via les blessures (dues au scalpage pour un arrachage manuel) et se développent plus facilement qu'en silo, où l'ambiance varie au cours du temps, et est plus ou moins favorable au développement de maladies (conditions non-contrôlées). C'est notamment l'une des raisons pour laquelle le stockage en chambre n'est pas développé dans la thèse (conditions non-réelles).

En travaillant sur le stockage silo, le facteur arrachage est prédominant sur les deux années. En année 1 (modalité « manuel » uniquement en fin de stockage) il est responsable de 32 % de la variabilité ; 43 % en année 2. Ensuite, intervient le facteur durée (19 % en année 1 ; 13 % en année 2). Le reste de la variabilité est expliqué par des interactions : l'interaction lieu/durée (11 %) en année 1, et l'interaction arrachage/durée (14 %) en année 2. L'interaction des deux facteurs prédominants (arrachage/durée) est à l'image des observations précédentes. Sans blessure, en arrachage manuel, il n'y a pas de développement de pourriture. En arrachage mécanique, avec blessures, il y a un développement de pourriture, accentué avec la durée de stockage. Plus la durée de stockage est longue, plus les pathogènes sont nombreux.

Les facteurs variété et lieu apparaissent également significatifs en année 1 (respectivement 8 % et 5 %). À noter que sur l'ensemble des mesures, l'effet de la répétition biologique est moindre, et contribue à valider le protocole expérimental.

En arrachage mécanique, le facteur durée est prédominant (37 % en année 1 ; 47 % en année 2) ; ensuite le facteur variété (22 % en année 1 ; 17 % en année 2). Le facteur lieu est significatif en année 2 (11 %) ; le reste de la variabilité s'explique par l'interaction lieu/durée (7 % en année 1 ; 3 % en année 2).

En raison d'indices de pourriture nuls, la modalité « arrachage manuel » n'a pas été évaluée ici.

Les facteurs arrachage et durée sont donc les facteurs impactant en majorité cette mesure. Les facteurs variété et lieu interviennent ensuite.

Les IP sont nuls à J0 (et les mesures n'ont été faites qu'à partir de 350°j int en année 1). À 250°j en année 2 (début du développement de pourriture), le facteur arrachage et l'interaction

arrachage/lieu sont responsables de la majeure partie de la variabilité des résultats (respectivement 42 % et 11 %).

En fin de stockage, le facteur arrachage explique plus de la moitié de la variabilité (57 % en année 1 ; 68 % en année 2). Ensuite, les facteurs lieu (13 % en année 1 ; 3 % en année 2) et variété (7 % en année 1 ; 9 % en année 2). Des interactions variété/arrachage (9 %) et lieu/arrachage (3 %) sont mesurées en année 2.

Les différences de développement de pourriture entre les deux sites peuvent s'expliquer par l'état sanitaire des parcelles, la flore microbologique présente, et la richesse en macroéléments du sol. La présence de maladies, de pathogènes des racines, ou encore, la carence en potassium, par exemple, serait néfaste à la conservation des racines. Le fait que Lillers soit le premier site récolté de ce projet est à prendre en compte également. Les réglages de l'arracheuse pourraient induire un arrachage plus agressif que sur le site d'Origny, d'où des blessures qui seraient plus prononcées (notamment en année 1 où le développement de pourriture est plus important sur Lillers).

La composition du sol et son état sanitaire au cours du développement des racines conditionneraient donc la conservation des racines au cours du stockage (les données de composition minérale des racines à J0 sont disponibles mais non traitées ; leur traitement fait partie de la partie perspective de la thèse).

ii. Essai CLD d'Origny

Dans l'essai CLD d'Origny, c'est un taux de pourriture qui a été calculé (cf. M&M).

L'intérêt ici est de comparer l'évolution du développement de pourriture en fonction de la modalité d'arrachage. Un arrachage classique, avec des réglages machine suivant les recommandations Tereos ; ou un arrachage agressif, pratiqué dans l'objectif de maximiser l'élimination de la terre des racines, en cas de conditions climatiques difficiles, ou encore, par négligence. L'arrachage manuel est évalué pour deux dates de prélèvement, uniquement en semaine 4 et 8 ; et la modalité chaulage a été testée à partir de la semaine 4.

L'évolution du taux de pourriture pour un arrachage classique a été suivi du jour de la récolte, jusqu'à la fin du stockage (406°j int). Pour l'arrachage agressif, il a été suivi à partir de la semaine 4 (265°j int).

En s'intéressant à l'évolution du taux de pourriture en silo, la comparaison avec la croissance microbologique se retrouve également dans cet essai (voir la figure n°34).

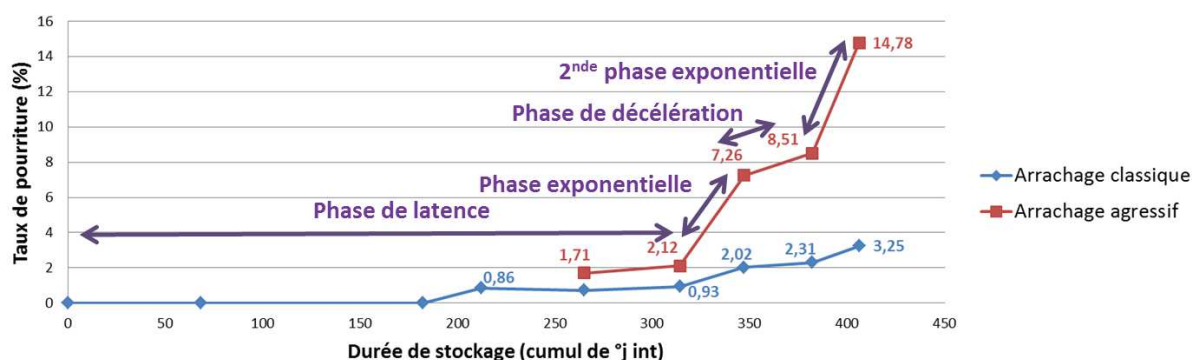


Figure n°34 : Évolution du taux de pourriture au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD (Origny).

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Les analyses statistiques montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du chaulage (pas de différence notable avec la modalité « arrachage classique »). Cette modalité ne sera donc pas traitée ci-après.

Le taux de pourriture reste nul en semaine 4 et en semaine 8 pour l'arrachage manuel, et significativement différent de celui des deux autres types d'arrachages (en semaine 4 et 8).

Les différences entre l'arrachage classique et l'arrachage agressif apparaissent significatives dès la semaine 4 (265°j int).

Dans cet essai, les facteurs arrachage et durée de stockage ont été évalués.

Ils ont tous les deux un effet significatif sur le développement de la pourriture (respectivement 38 % et 33 %) ; et leur interaction est également responsable d'une part de la variabilité des résultats (23 %).

Avec les mesures initiales de l'arrachage classique, la phase de latence est retrouvée de 0°j à 314°j int. Pour les deux types d'arrachages, la phase exponentielle se situe entre 314°j int et 347°j int. Celle-ci est cependant nettement plus marquée avec un arrachage agressif.

En fin de stockage, 4,5 fois plus de pourriture est mesuré comparé à l'arrachage classique.

Comme dans l'essai conservation/variété, la phase exponentielle est suivie d'une phase de décélération. Dans cet essai, cette dernière semble suivie d'une seconde phase de croissance microbiologique (comme pour V1 précédemment). En effet, pour les deux types d'arrachages, la phase de décélération se situe entre 347°j int et 382°j int ; et de 382°j à la fin de stockage, une seconde augmentation est observée. Avec un arrachage classique, cette dernière phase est plus progressive qu'avec un arrachage agressif. Avec un arrachage agressif, la dernière phase est assimilable à une seconde phase exponentielle (différence significative entre la semaine 7 et 8 : presque deux fois plus de pourriture en fin de stockage comparée à la fin de la phase de décélération, ici 382°j int).

Ce phénomène peut s'expliquer par la croissance d'une nouvelle population microbiologique en fin de stockage, qui se nourrirait de substrats différents. En effet, une première population de pathogènes, des bactéries du genre *Leuconostoc mesenteroides* par exemple (identifiées par C. Meade dans sa cartographie microbiologique), initierait les contaminations ; et une population opportuniste, des bactéries du genre *Acetobacter* et *Lactobacillus* par exemple

(également identifiées dans la cartographie microbiologique), se développerait ensuite, et consommerait d'autres sources d'énergie (alcools et acides).

En fin de stockage, l'arrachage agressif conduit à plus de quatre fois plus de pourriture qu'un arrachage classique.

b. Résistance physique

Sur les deux années, par pénétrométrie, la fermeté de différentes variétés a été mesurée dans le cadre du projet conservation/variétés.

En année 1, les mesures ont été réalisées pour chaque sortie.

Les variétés 2, 3 et 5 ont les résistances physiques les plus élevées. La variété 4 a une résistance physique intermédiaire, et V1 se distingue nettement des autres variétés avec la résistance physique la plus faible (voir la figure n°35).

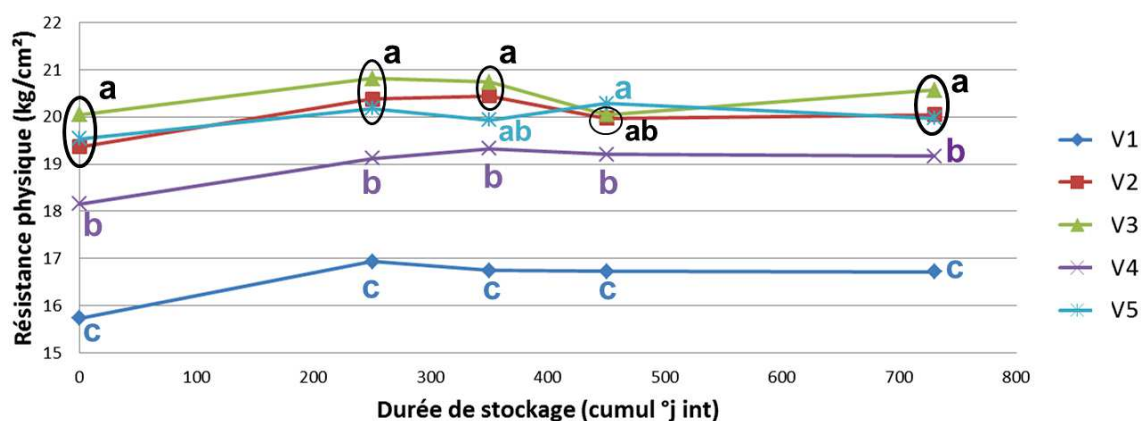


Figure n°35 : Résistances physiques au cours du stockage en fonction de la variété - Essai conservation/variétés - Année 1 - Stockage silo/arrachage mécanique.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En raison d'un effet durée largement inférieur à l'effet variété (4 % contre 85 %), seules les mesures de début et de fin de stockage ont été effectuées en année 2, sur un effectif plus grand (cf. M&M).

En année 2, le facteur variété reste prédominant sur la mesure (responsable de 87 % de la variabilité). Le facteur durée apparaît faiblement significatif (7 %).

La variété 1 se distingue nettement des autres avec une faible dureté, comme observé en année 1 (voir la figure n°36). En moyenne, V1 a une dureté de 16,5 kg/cm², contre une moyenne de 20,5 kg/cm² pour les variétés 2 et 3, toutes durées confondues.

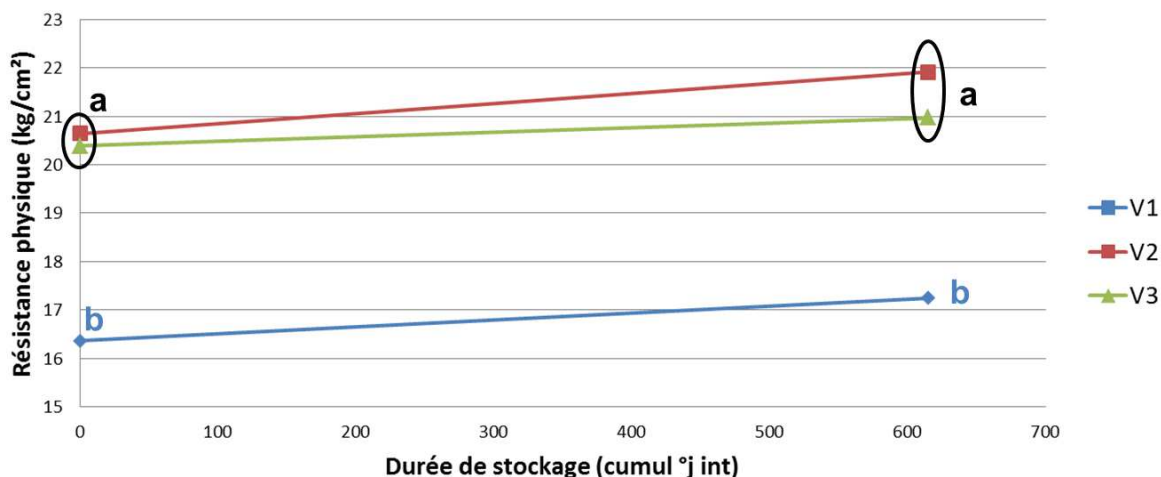


Figure n°36 : Résistances physiques au cours du stockage - Essai conservation/variétés - Année 2 – Stockage silo/arrachage mécanique.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Concernant le facteur durée, il est observé une augmentation de la résistance physique au cours du stockage (voir les figures n°35 et n°36).

Le Penefel automatique, utilisé dans cette étude, est employé sur fruits croquants. Il est donc adapté pour les mesures de fermeté sur des chairs fermes. Dans le cas de produits à chair molle, l'augmentation de la force appliquée pour pénétrer les produits serait due à la déformation de l'épiderme au contact de l'embout normalisé. Comme l'épiderme épouse le mouvement de l'embout, une force supérieure doit être appliquée pour pénétrer le produit.

Au cours du stockage, les racines perdent du poids (voir l'annexe n°14). Cette perte de poids est associée à une perte d'eau ; principalement due à l'évaporation de l'eau provenant des racines. Ce phénomène s'explique par une pression de vapeur d'eau contenue dans les racines supérieure à la pression environnante [Letang, 1997]. L'augmentation des valeurs obtenues en fin de stockage avec le Penefel automatique sera ici attribuée au flétrissement des racines (et non à une augmentation de la fermeté de l'épiderme au cours du stockage).

Une limite de la méthode d'analyse est ici mise en évidence. L'analyse des résultats de résistance physique est pour cette raison focalisée sur les mesures à J0.

En année 2, pour le jour de la récolte, les facteurs variété et lieu sont responsables de la majeure partie de la variabilité (respectivement 91 % et 6 % ; uniquement le facteur variété en année 1).

C'est sur le site de Lillers que les fermetés sont légèrement plus élevées (plus 0,5 % comparé à Origny). La nature du sol jouerait donc un rôle mineur sur les caractéristiques structurales des racines, avant la récolte. En effet, au cours de leur développement, les racines sont dépendantes de la composition du sol dans lequel elles se développent. La disponibilité des ions calcium et magnésium notamment, qui interviennent dans l'organisation de la structure pariétale (des pectines notamment), pourrait expliquer les différences de fermeté d'un site à l'autre (à corrélérer ultérieurement avec les analyses de composition minérale des racines ; voire des analyses de sol).

Les caractéristiques variétales annoncées par le semencier (cf. le tableau n°4) sont ici vérifiées ; avec une performance plus élevée que celle attendue pour V3 au test de pénétrométrie. On observe qu'avec une faible résistance physique, V1 a l'IP le plus fort ; et qu'avec une résistance physique parmi les plus élevées, V2 a l'IP le plus faible, comme attendu par le semencier. V3 a un comportement intermédiaire, avec une résistance physique élevée et un IP intermédiaire.

En s'intéressant à la corrélation entre la résistance physique à J0 et l'IP en fin de stockage pour les cinq variétés en année 1, il ne semble pas y avoir de lien entre les deux mesures (voir la figure n°37). Alors que le R^2 de 0,7, identifié par le partenaire dans ses essais internes, est retrouvé en année 2, en ne travaillant que sur les trois variétés étudiées sur les deux années (voir figure n°38, données de l'année 2 en orange).

Leurs études internes ont été menées sur environ 200 variétés, avec des indices de pourriture plus élevés que dans le cadre de cet essai. Avec un échantillonnage plus représentatif en année 2 (30 mesures/répétition, au lieu de 12) et en ne considérant que les variétés extrêmes (V1 et V2) et une variété intermédiaire (V3), la tendance est retrouvée.

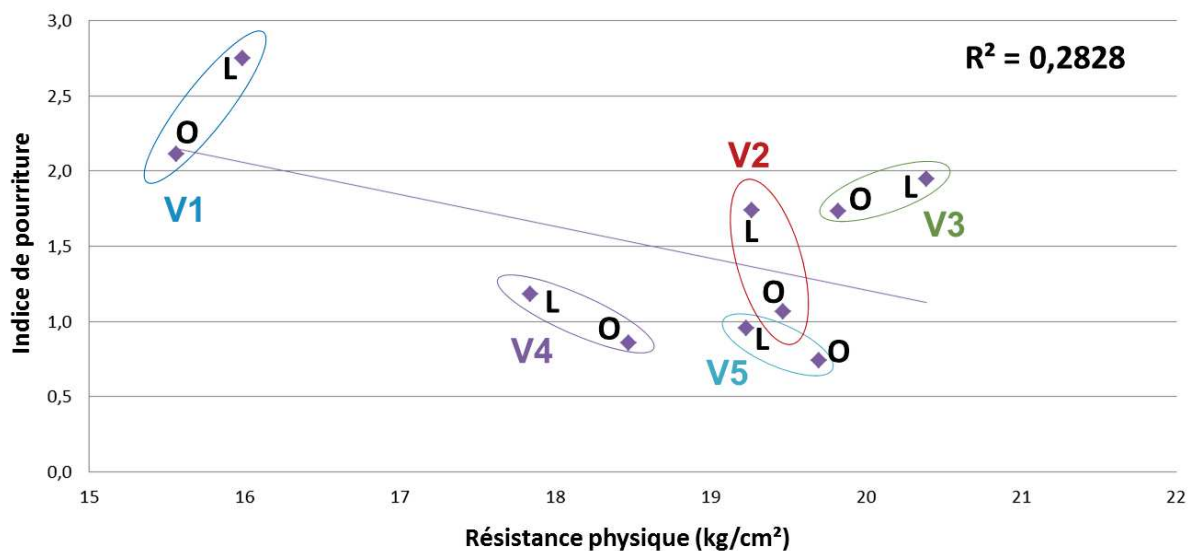


Figure n°37 : Corrélation entre l'IP de fin de stockage et la résistance physique à la récolte - Essai conservation/variétés - Année 1 – 5 variétés.

L → site de Lillers.

O → site d'Origny.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

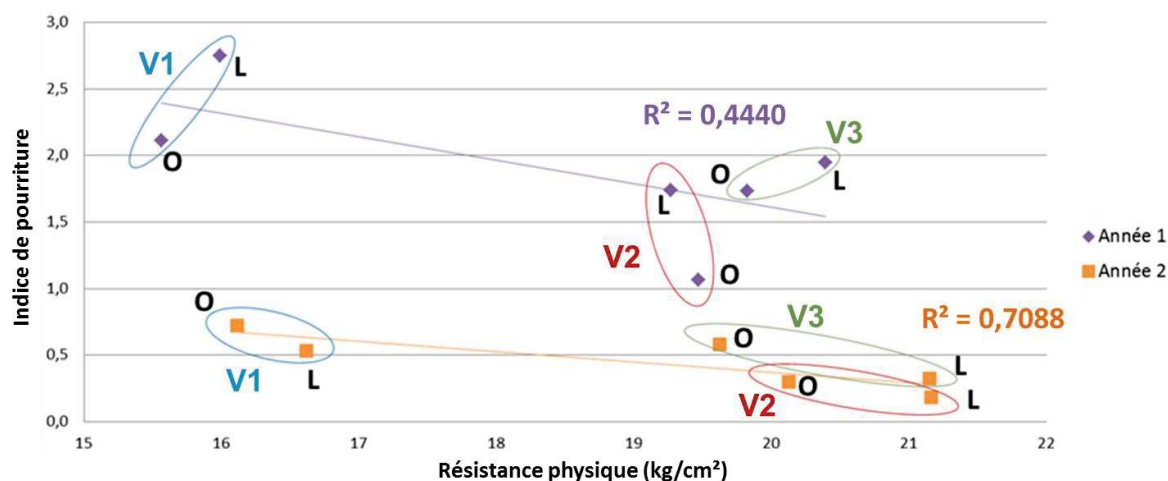


Figure n°38 : Corrélation entre l'IP de fin de stockage et la résistance physique à la récolte - Essai conservation/variétés – Résultats pour les 3 variétés étudiées sur 2 ans.

L → site de Lillers.

O → site d'Origny.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

c. Marc

En approfondissant les aspects physiques des racines, il est intéressant de se pencher sur la fraction insoluble. Et plus particulièrement les fibres, qui apportent résistance, imperméabilité et organisation aux parois des cellules.

Comme précisé dans la partie M&M, en année 1, dans le cadre du projet conservation/variété, c'est un marc calculé qui a été utilisé. Ce n'est donc pas la réelle fraction insoluble qui est évaluée car tous les sucres n'ont pas été éliminés.

En année 2, avec la méthode de l'IRS, le marc a été mesuré, et non pas calculé.

On s'aperçoit qu'en comparant les deux années, les résultats de marc (fibres et pectines) sont plus élevés en année 1 qu'en année 2 (voir la figure n°39). En effet, les mesures de l'année 2 ont été plus précises avec l'élimination de la fraction soluble ; la suite du document est alors basée sur les résultats de l'année 2.

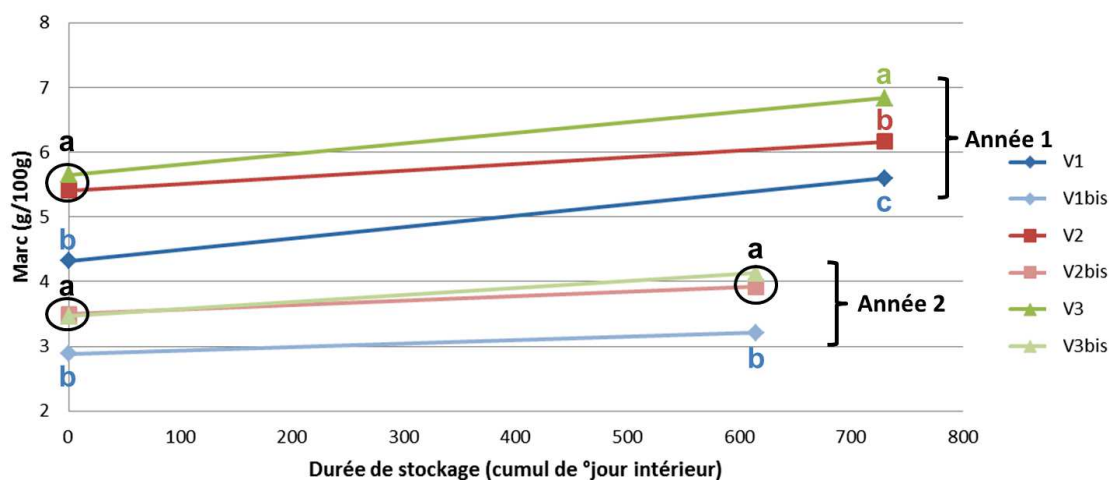


Figure n°39 : Évolution du marc au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés – Résultats pour les 3 variétés sur les 2 années – Arrachage mécanique.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Les variétés V2 et V3 ont les concentrations en marc les plus élevées. La variété V1 a la concentration la plus faible sur les deux années (voir la figure n°36).

Les résultats de l'analyse statistique révèlent que c'est le facteur variété qui est prédominant sur cette mesure (59 % en année 2).

Le facteur durée est également significatif (11 % en année 2). C'est une augmentation du marc qui est observée sur les deux années.

Un effet lieu de 10 % est évalué en année 2. Les teneurs sont plus élevées sur le site de Lillers, de 10 % à J0 comparé aux teneurs du site d'Origny ; de 6 % en fin de stockage (voir la figure n°40).

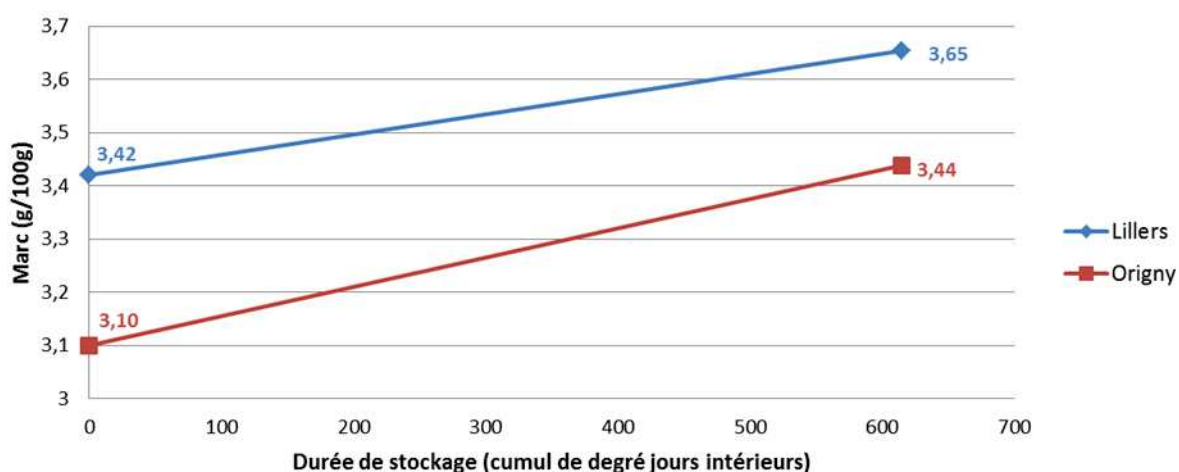


Figure n°40 : Teneurs en marc au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Regroupement des 3 variétés - Année 2.

La nature et la composition du sol sembleraient également jouer un rôle sur les teneurs en marc à la récolte. À noter que sur le site de Lillers, où les teneurs en marc sont les plus élevées, les résistances physiques sont également les plus élevées, en année 2 (et les IP plus faibles). Comme mentionné précédemment, l'analyse de la composition minérale des racines serait à corrélérer avec des analyses de sol.

En fin de stockage, un effet arrachage est relevé (9 % en année 2). Les teneurs en marc sont légèrement plus élevées avec un arrachage mécanique (voir la figure n°41).

Il semblerait que la production de la fraction insoluble dans les racines soit accentuée en présence de blessures. Les blessures étant plus importantes avec un arrachage mécanique, on peut supposer ici que l'augmentation du marc est liée à la synthèse d'éléments insolubles (de fibres notamment), pour la cicatrisation.

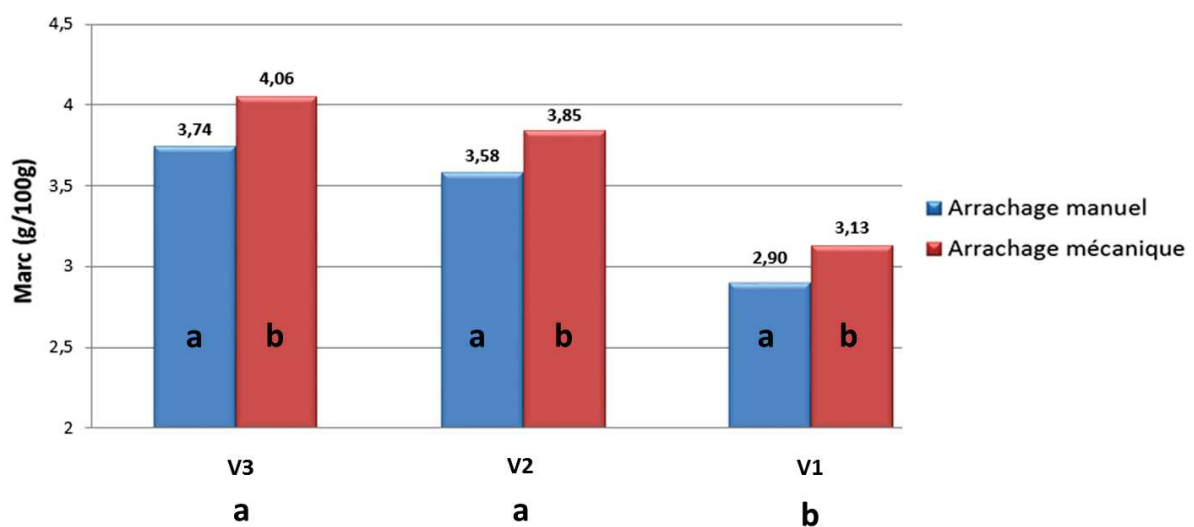


Figure n°41 : Concentrations en marc en fin de stockage par variété en fonction de l'arrachage – Essai conservation/varieties - Année 2.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les variétés assignées de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey.

Si l'on s'intéresse au lien avec la résistance physique, on observe logiquement qu'une variété avec une teneur en marc élevée, a une dureté élevée ; et inversement (voir la figure n°42). Il est observé que plus la proportion de fraction insoluble est élevée (fibres et pectines), plus l'épiderme des variétés est ferme.

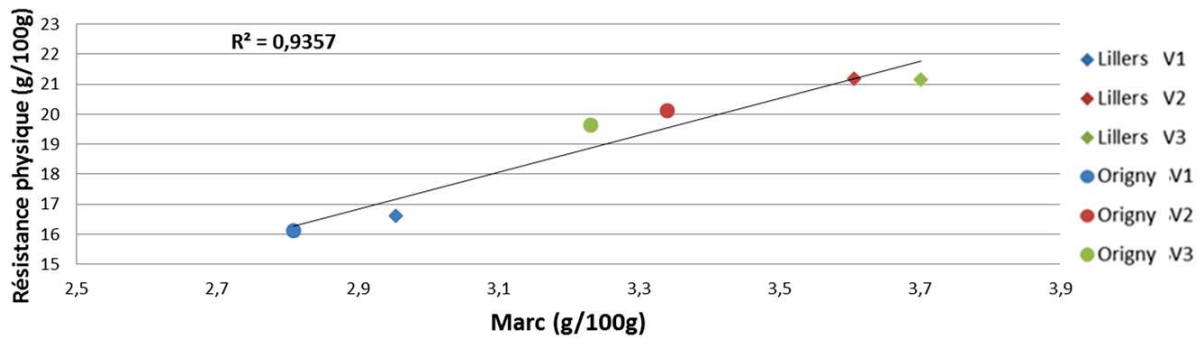


Figure n°42 : Corrélation entre la résistance physique et la concentration en marc (fraction insoluble) le jour de la récolte - Essai conservation/variété année 2 (méthode IRS pour le marc)

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

L'effet lieu est retrouvé sur la figure n°42, avec des teneurs en marc plus élevées sur le site de Lillers. Cette corrélation est également vraie en travaillant par date ou par lieu (voir les annexes n°15a à n°15d). Il semblerait que la dureté des racines soit en partie expliquée par leurs teneurs en marc.

Une corrélation négative est mesurée entre les teneurs en marc et les IP (plus les teneurs en marc sont élevées, moins les IP sont forts) ; mais faiblement significative ($R^2 = 0,5$).

d. Fibres

En zoomant sur la partie insoluble, on s'intéresse ici à la cellulose, l'hémicellulose et la lignine des échantillons du projet conservation/variétés. Quantifier individuellement chacune de ces fibres et connaître leur évolution au cours du stockage permet d'aller plus loin dans les connaissances structurelles des racines (composition du marc), et aussi sur leur processus de cicatrisation.

En année 1, le comportement intermédiaire des variétés 4 et 5 est retrouvé. V1 a la plus faible proportion de fibres, opposée à V3 qui possède la plus forte. V2 occupe une position centrale (voir la figure n°43).

C'est le facteur variété qui est prédominant (mesures à J0 uniquement, cf. M&M). Il est responsable de 72 % de la variabilité des résultats.

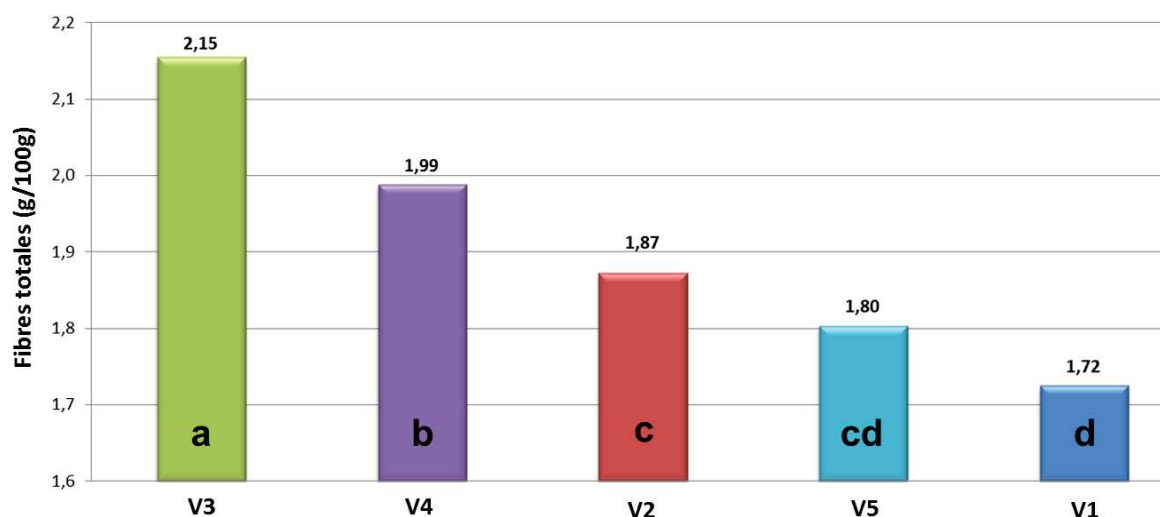


Figure n°43 : Concentrations en fibres totales par variété le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 1.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En année 2, les mesures ont été faites en début et en fin de stockage. Le facteur durée est prédominant sur la variété (59 % contre 12 %). Et un effet lieu de 9 % est évalué (teneurs plus élevées sur le site de Lillers).

Comme pour le marc, c'est une augmentation des teneurs en fibres qui est mesurée en année 2 (en moyenne, 44 % de fibres en plus en fin de stockage comparé au résultat à J0 ; voir la figure n°44). Ces résultats appuient l'hypothèse de la synthèse de fibres pour la cicatrisation des blessures et également du scalpage du collet.

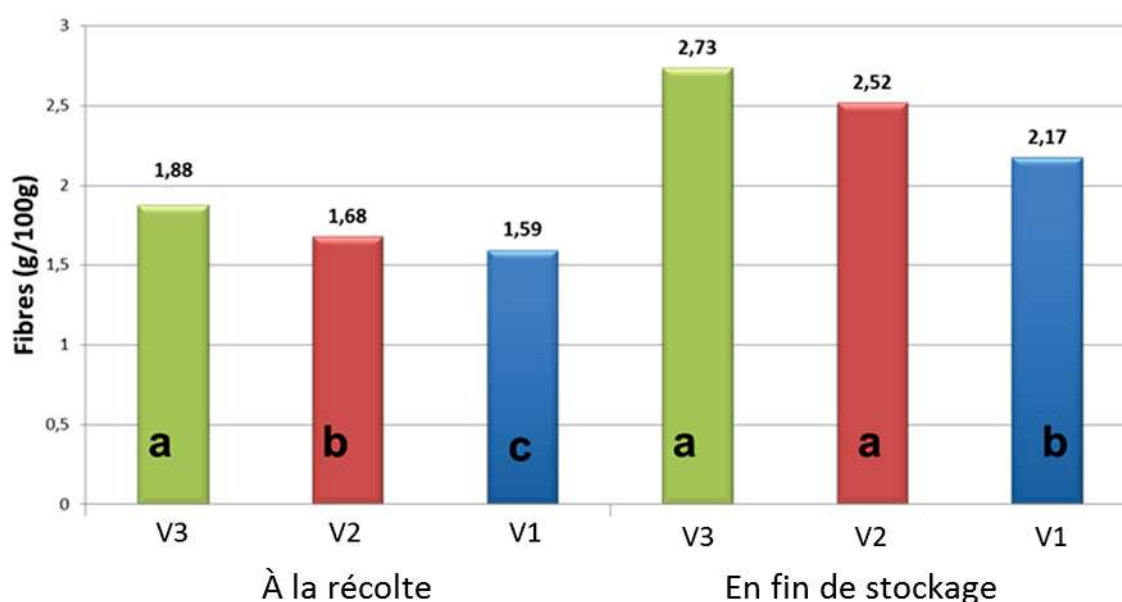


Figure n°44 : Concentrations en fibres totales par variété le jour de la récolte et en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Si l'on se limite au jour de la récolte en année 2, c'est le facteur variété qui est prédominant (50 %). L'effet lieu apparaît également significatif (27 %).

Sur les 2 années, V3 a les teneurs en fibres les plus élevées, ensuite V2, puis V1, avec des teneurs significativement plus faibles (voir les figures n°43 et n°44).

En fin de stockage en année 2, le classement des variétés reste comparable au classement initial (V2 rejoint la classe de V3, la classe « a »). Et les facteurs variété et lieu sont responsables de la majeure partie de la variabilité des résultats (respectivement, 31 % et 24 %). C'est sur le site de Lillers en année 2, que les teneurs en fibres sont les plus élevées, en début et en fin de stockage (respectivement, de 13 % et 18 % comparé aux résultats d'Origny). Ici aussi, il apparaît que le lieu, et donc, le contexte pédoclimatique de croissance, impacte la mesure, et jouerait un rôle dans la capacité à la conservation des racines.

En année 2, le site de Lillers enregistre également des racines avec une résistance physique supérieure à celle d'Origny, et un IP moins élevé.

Pour le gain en fibres, il n'y a pas de différences significatives entre les variétés avec un arrachage manuel. Avec un arrachage mécanique, la variété V1 se différencie des deux autres (voir la figure n°45).

La cicatrisation pourrait expliquer les teneurs plus élevées en fin de stockage, et pour un arrachage mécanique. L'hypothèse d'une réorganisation et d'une restructuration des cellules suite aux blessures d'arrachage comme explication de l'augmentation des teneurs en fibres et en marc, notamment en arrachage mécanique, est appuyée ici.

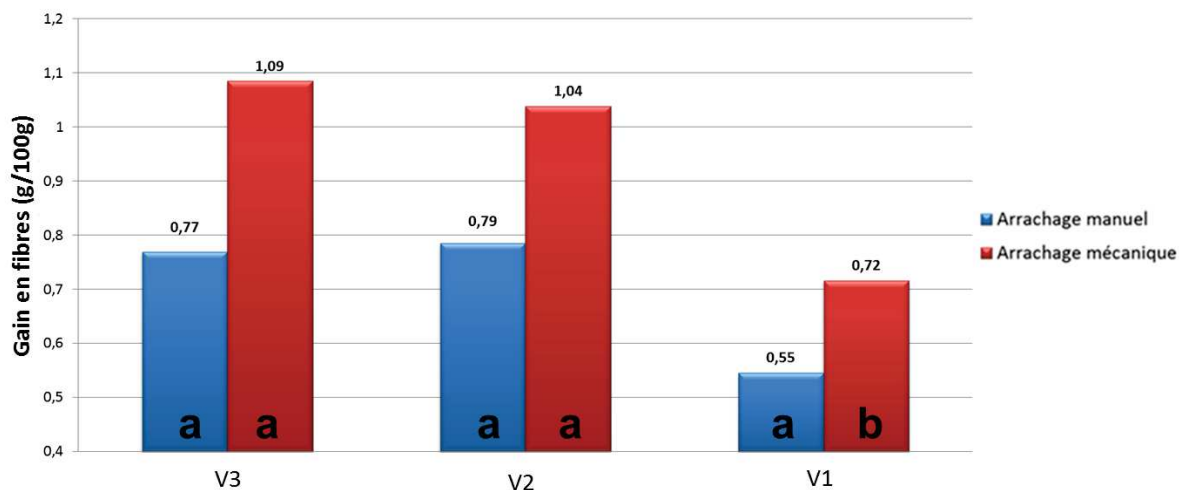


Figure n°45 : Gain en fibres en fin de stockage par variété en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Si l'on s'intéresse à la corrélation entre le marc et les fibres, l'effet durée est à prendre en compte. En début de stockage, ces deux mesures ne sont pas fortement corrélées ($R^2 : 0,58$). En fin de stockage, on retrouve une corrélation significative (voir la figure n°46). Cela

signifie qu'une autre variable contribuerait davantage à la composition du marc en début de stockage (voir plus loin la mesure des pectines).

Il semblerait que l'augmentation des teneurs en marc au cours du stockage soit liée à la synthèse de fibres.

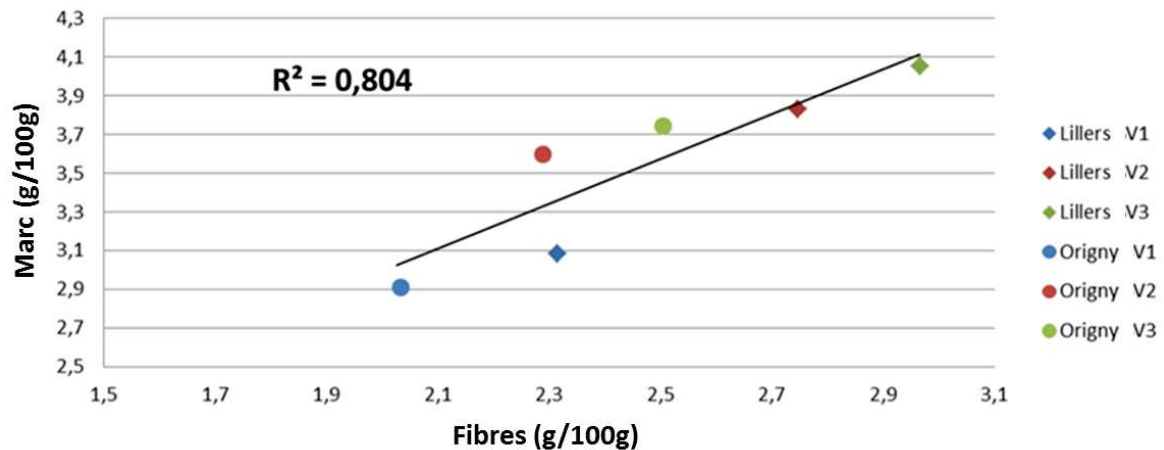


Figure n°46 : Corrélation entre le marc et les fibres en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

Il n'a pas été trouvé de corrélation significative entre la résistance physique et les fibres ; ni entre les IP et les fibres.

❖ Hémicellulose

Grâce aux tests statistiques, la variabilité des résultats d'hémicellulose s'explique à environ 70 % dans le cadre du projet conservation/variétés. En raison d'une part d'inconnue trop importante pour la cellulose et la lignine (plus de 50 %), leurs résultats ne sont pas présentés ici.

En année 1, les variétés 3 et 4 ont les teneurs les plus élevées ; les variétés 1, 5 et 2 font parties de la classe inférieure (mesures effectuées uniquement à J0, voir figure n°47).

C'est le facteur variété qui est responsable de la majeure partie de la variabilité des résultats (66 %).

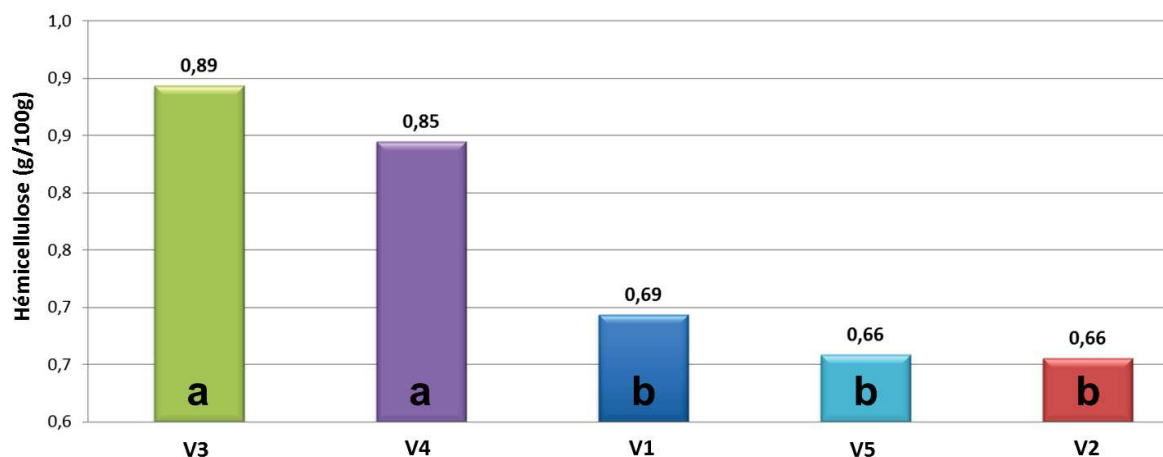


Figure n°47 : Concentrations en hémicellulose par variété le jour de la récolte - Essai conservation/variétés - Année 1.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En année 2, à J0, l'effet variété est retrouvé (34 %). Un effet lieu est également évalué (17 %). D'une année à l'autre, la variété 3 conserve les teneurs en hémicellulose les plus élevées, même si elle n'est pas statistiquement différente de V1 en année 2.

En considérant l'ensemble des mesures (J0 et en fin de stockage), il est observé que l'effet durée est prédominant (74 %). Les teneurs en hémicellulose sont en moyenne doublées entre le début et la fin du stockage (voir la figure n°48).

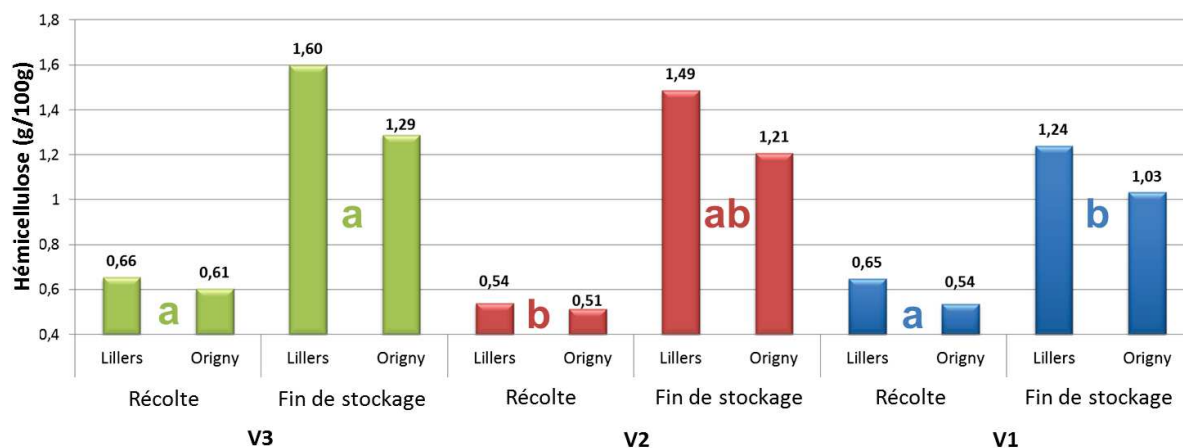


Figure n°48 : Concentrations en hémicellulose par variété le jour de la récolte et en fin de stockage - Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En fin de stockage (année 2), les effets lieu et variété sont significatifs (respectivement, 20 % et 19 %). Comme vu dans les mesures de fibres totales, de marc, ou encore de résistance physique, le facteur lieu est significatif pour la conservation des racines en silo. Ici, comme

pour les autres mesures, le site de Lillers a les teneurs les plus élevées (en moyenne, 11 % d'hémicellulose en plus à J0 comparé au site d'Origny ; 22 % en plus en fin de stockage).

De par sa composition, le sol interfère avec les éléments structurels des racines, et pourrait ainsi influencer leur capacité au stockage. L'hémicellulose crée les liaisons entre les microfibrilles de cellulose : plus une racine en contient, plus la structure de sa paroi cellulaire est rigide.

La synthèse d'hémicellulose serait responsable de l'augmentation des teneurs en fibres au cours du stockage, ainsi que des différences variétales observées. Les différentes variétés ne sont pas équipées du même matériel génétique ; certaines pourraient avoir une activité de synthèse des structures cellulaires plus réactive que d'autres (voir V3 qui est significativement différente de V1 en fin de stockage).

En fin de stockage (année 2), l'effet arrachage serait non-significatif sur Origny ; contrairement à Lillers, où les teneurs en hémicellulose sont plus élevées avec un arrachage mécanique (plus 42 % comparé à l'arrachage manuel, voir l'annexe n°16).

Avec la méthode d'analyse utilisée, l'évolution des teneurs en fibres est alors fortement corrélée à celle des teneurs en hémicellulose (voir la figure n°49).

Et en faisant le parallèle avec la corrélation entre le marc et les fibres en fin de stockage, l'hémicellulose semble contribuer à l'évolution des teneurs en marc (voir la figure n°50).

Aucune corrélation n'a été trouvée entre l'hémicellulose et la résistance physique ; ni entre l'hémicellulose et les IP.

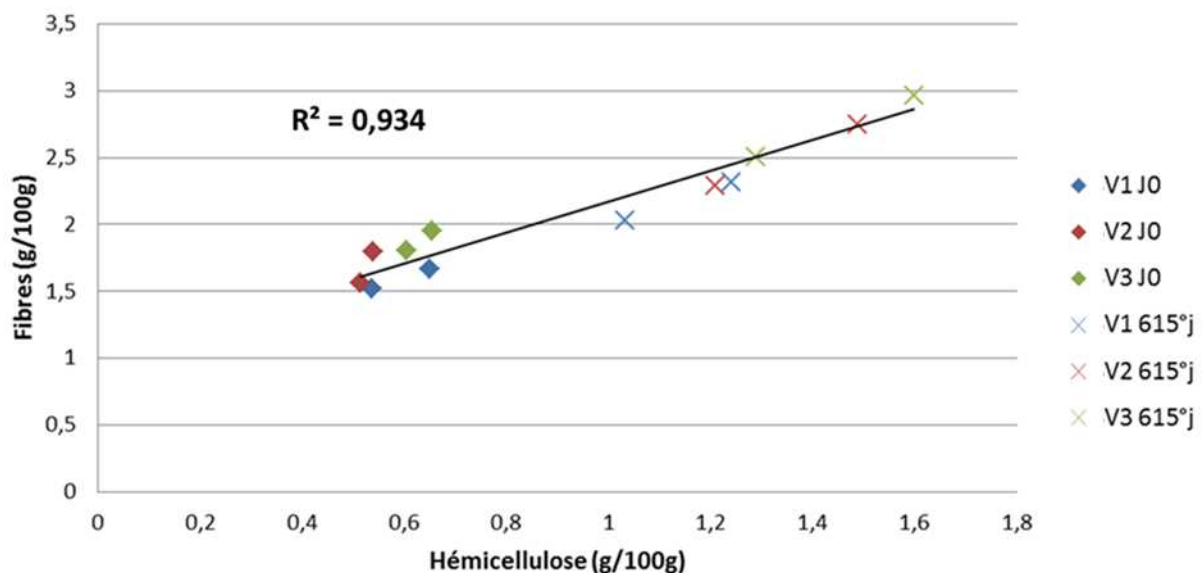


Figure n°49 : Corrélation entre les résultats d'hémicellulose et de fibres – Essai conservation/variétés – Année 2.

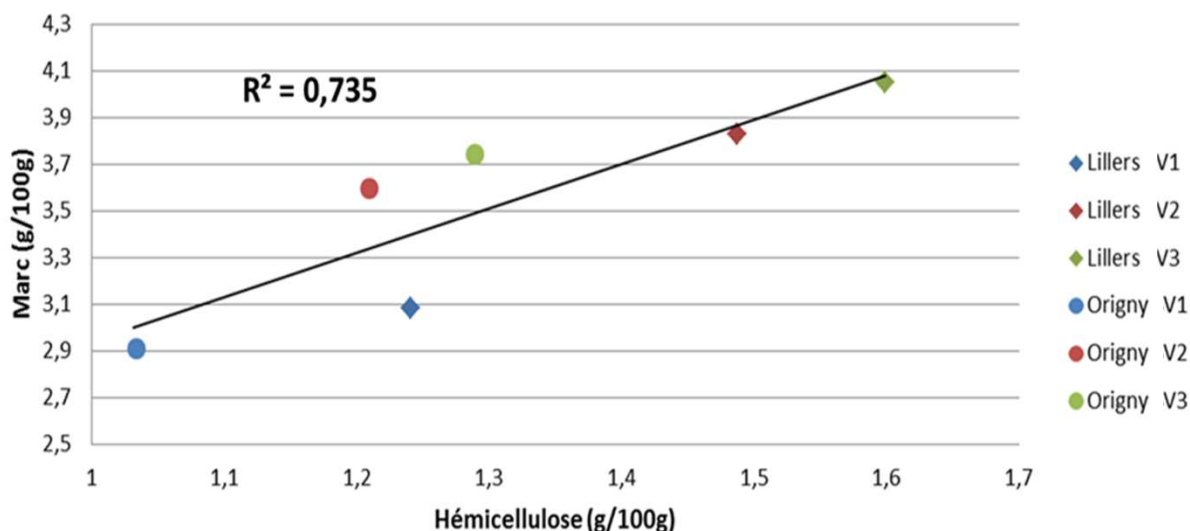


Figure n°50 : Corrélation entre les résultats d'hémicellulose et de marc en fin de stockage – Essai conservation/variétés – Année 2.

Dans le cadre de cette étude, avec les limites de la méthode d'analyse des fibres (présentées dans la partie M&M), il semblerait que l'hémicellulose soit la fibre principale de la cicatrisation des racines. Comme mentionné précédemment, sa synthèse permettrait de créer de nouvelles liaisons entre les microfibrilles de cellulose (cassées lors de l'arrachage, avec les blessures sur les racines), et ainsi consolider la matrice extracellulaire (MEC) des racines, et combler les brèches créées lors de l'arrachage.

e. Pectines

Grâce aux mesures de marc et de fibres réalisées dans le cadre du projet conservation/variétés, les teneurs en pectines ont pu être estimées. Il s'agit du gel dans lequel baignent les fibres. Il constitue le ciment de la paroi pectocellulosique des cellules végétales. En usine, ce polymère est gênant pour des pH < 4,5 et > 6,5. Il engendre des problèmes de filtration et ralentit alors le procédé industriel [Cuddihy et al., 2001].

En année 1 (données uniquement le jour de la récolte), à J0, les variétés 2 et 3 ont les teneurs les plus élevées. Ensuite, les variétés V5 et V4, puis V1 avec les teneurs les plus faibles (voir la figure n°51).

Les facteurs variété et lieu sont prédominants. Ils sont respectivement responsables de 69 % et 12 % de la variabilité des résultats.

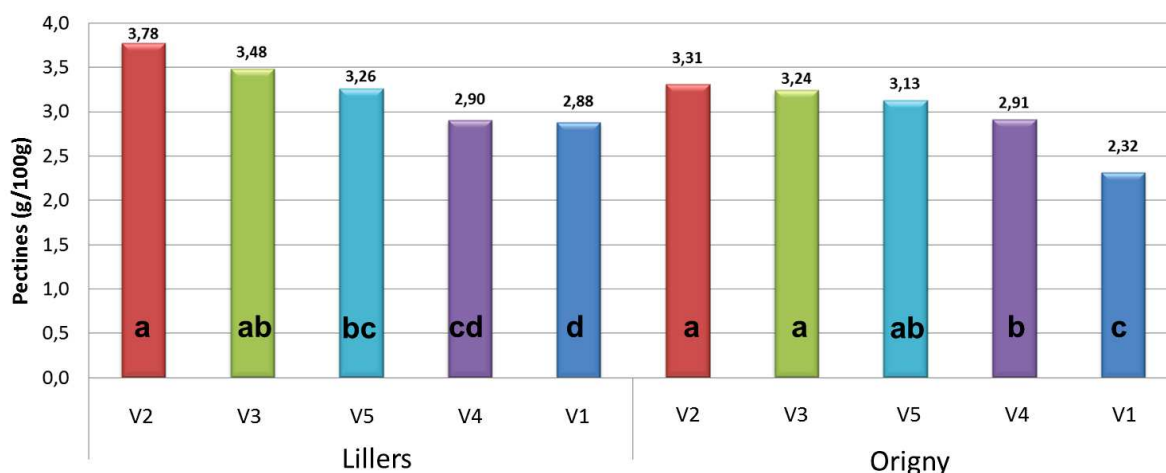


Figure n°51 : Concentrations en pectines par variété et par lieu le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 1.

Regroupement des 2 types d'arrachage et des 3 répétitions biologiques par variété. Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En année 2, les mêmes tendances variétales sont retrouvées (voir la figure n°52). Le facteur variété est également prédominant le jour de la récolte (54 %).

En considérant les données à J0 et en fin de stockage, les facteurs durée et variété expliquent la majeure partie de la variabilité des résultats (respectivement, 39 % et 25 %).

Une baisse des teneurs en pectines est observée au cours du stockage (en moyenne, 31 % de moins en fin de stockage, comparé au résultat à J0).

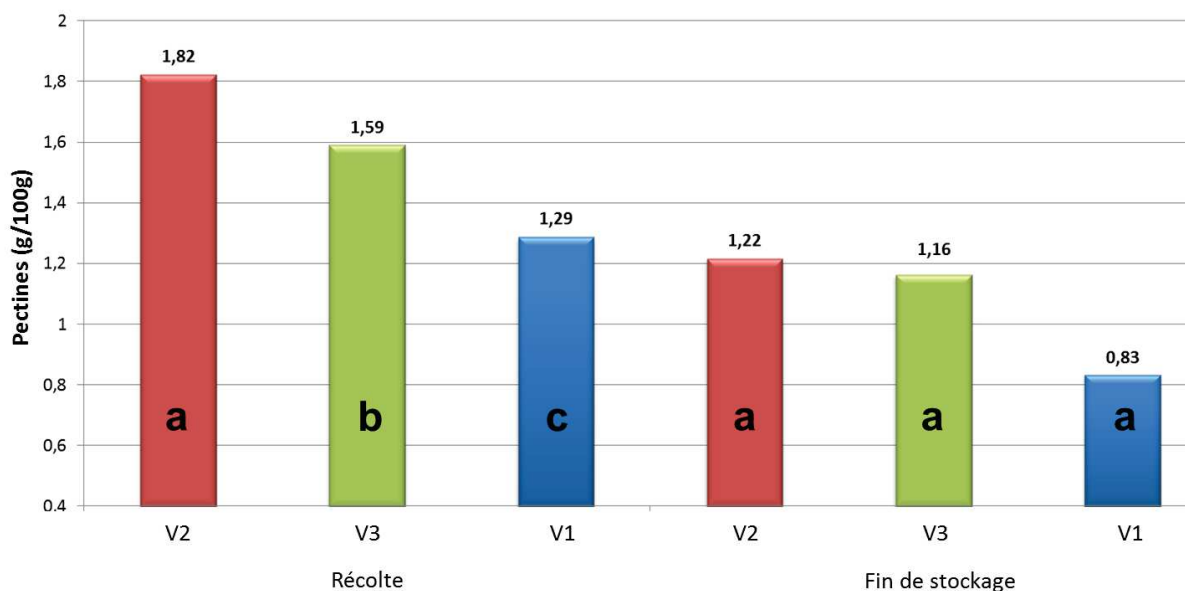


Figure n°52 : Concentrations en pectines par variété le jour de la récolte et en fin de stockage – Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des 2 sites et des 3 répétitions biologiques par variété. Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Pour l'ensemble des variétés, les teneurs en pectines sont en moyenne plus élevées sur le site de Lillers le jour de la récolte sur les 2 années (11 % de plus en moyenne, comparé aux résultats d'Origny en année 1). Comme observé dans les mesures précédentes, le sol de Lillers permettrait un développement de la structure des racines plus important que le sol d'Origny. Plus de fibres, plus de pectines, plus de marc à J0, peuvent être assimilés à davantage de résistance physique à la récolte.

En fin de stockage, le facteur variété reste prédominant (30 %), malgré des différences non significatives entre les variétés. Le lieu est également significatif (11 %).

Il est donc observé une dégradation des pectines au cours du stockage. Un article reporte la perte de viscosité intrinsèque ainsi que de la force mécanique du gel des pectines au cours du stockage [Morris et al., 2010]. Un autre article mentionne la dégradation des pectines chez les fruits matures et blessés [Huber, et al., 2001].

Cette observation pourrait contribuer à expliquer l'évolution du marc au cours du stockage (les pectines et les fibres sont les deux composantes du marc).

Si l'on s'intéresse à la corrélation entre le marc et les pectines en début de stockage (en année 2), ces deux mesures sont corrélées (voir la figure n°53). À la différence de la corrélation entre le marc et les fibres à J0, qui n'est pas vérifiée dans le cadre de cette étude.

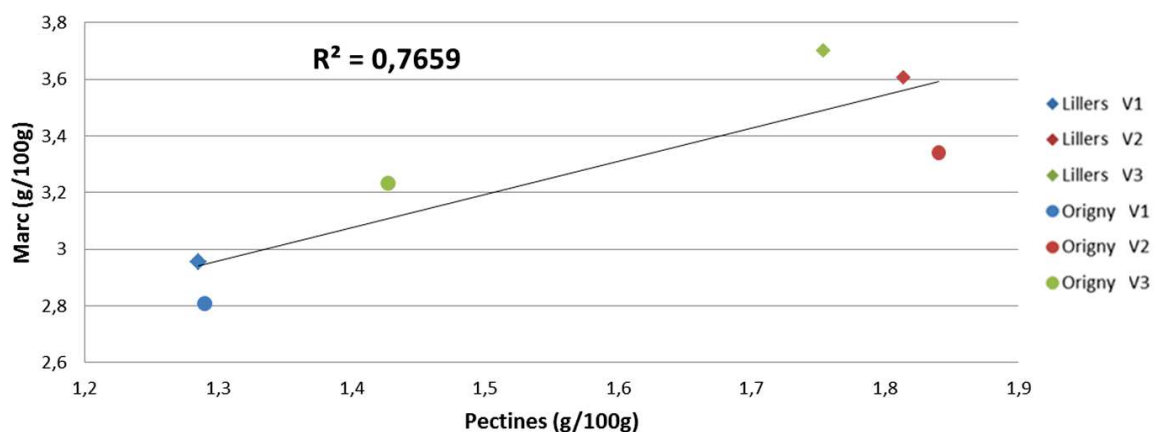


Figure n°53 : Corrélation entre le marc et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

Au cours du développement de la racine (en champ), le gel de pectines entoure les cellules des racines et assure la cohésion des fibres, en renforçant ainsi la structure physique des cellules. Cette observation se retrouve dans la corrélation entre la concentration en pectines et la résistance physique des racines en début de stockage (voir la figure n°54).

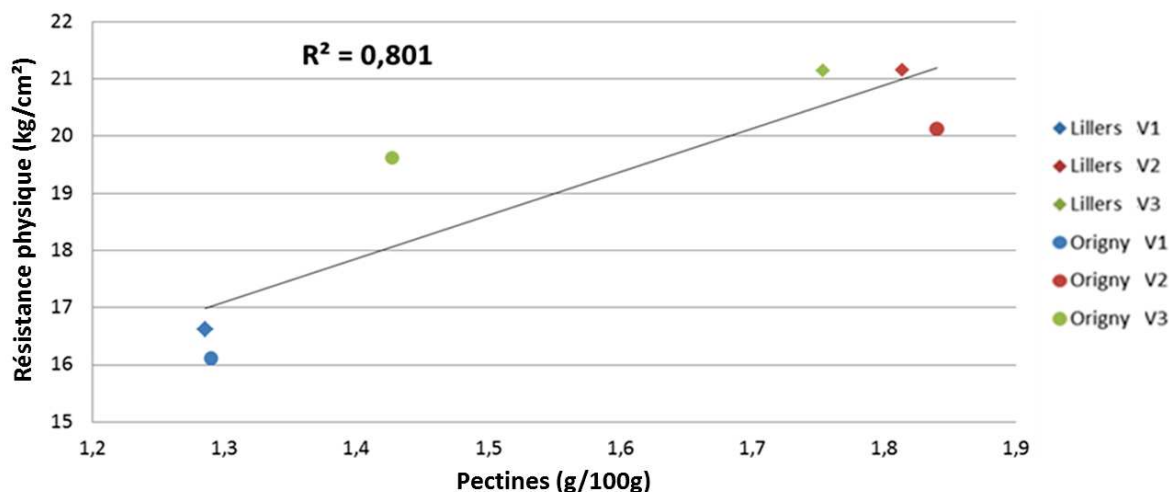


Figure n°54 : Corrélation entre la résistance physique et les pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

En observant la répartition des variétés sur ces deux dernières figures, les comportements extrêmes de V1 et V2 sont retrouvés ; ainsi que le comportement intermédiaire de V3.

Le jour de la récolte, V1 a de faibles concentrations en marc et en pectines, se traduisant par une faible résistance physique. C'est le comportement inverse pour V2. Et concernant V3, un comportement similaire à celui de V2 est retrouvé sur le site de Lillers ; alors que sur le site d'Origny, de faibles concentrations en pectines sont mesurées à la récolte. Ce comportement n'est pas retrouvé en année 1 (voir l'annexe n°17).

Pour l'année 2, l'IP de V3 est presque deux fois plus élevé sur le site d'Origny, que sur celui de Lillers. Et la corrélation entre la concentration en pectines et le développement de pourriture est vérifiée (voir la figure n°55). Cette observation suggère que les pectines contribueraient fortement à la résistance à la pourriture des racines.

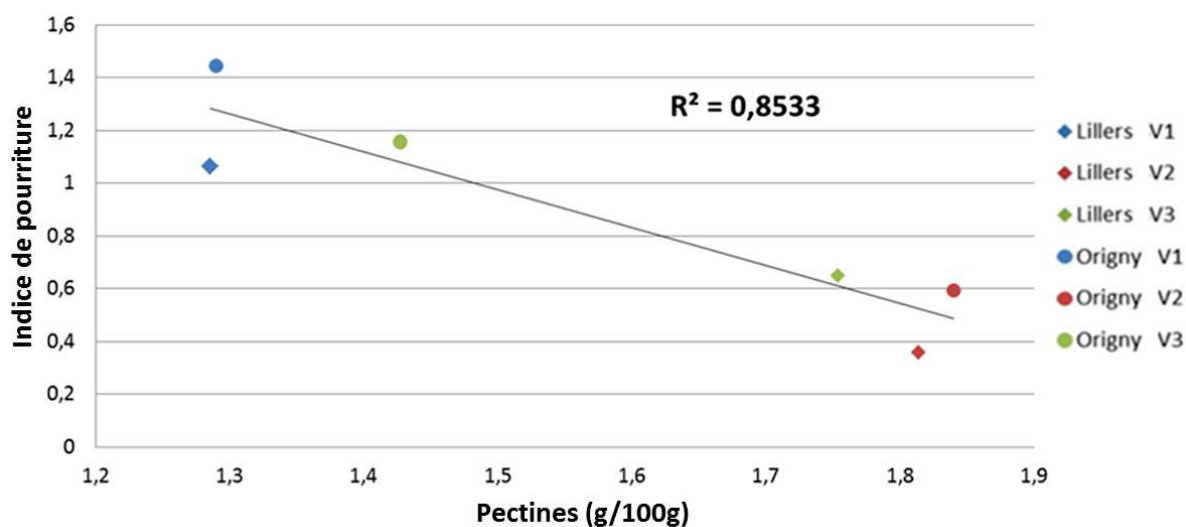


Figure n°55 : Corrélation entre le développement de pourriture de fin de stockage et la concentration en pectines le jour de la récolte – Essai conservation/variétés - Année 2.

Un point représente la moyenne des 3 répétitions biologiques d'une variété.

Concernant l'évolution des concentrations en pectines au cours du stockage, il est à supposer que, suite à l'arrachage, le gel de pectines est dégradé et que la synthèse de fibres assure la cicatrisation. La corrélation entre les pectines et le marc n'est pas retrouvée en fin de stockage ($R^2 = 0,34$) ; alors qu'elle est vérifiée entre les fibres et le marc (voir la figure n°46).

La précision de la mesure des pectines dans cet essai pourrait être améliorée (valeurs calculées). Pour de futurs essais, il serait judicieux d'extraire les pectines pour les quantifier plus précisément.

❖ Conclusion sur les changements physiques au cours du stockage

Les changements physiques des racines pendant le stockage sont dépendants du développement de pourriture, de la fermeté épidermique des racines, et de la fraction insoluble (marc : fibres et pectines).

Pour le développement de pourriture, le facteur arrachage est responsable de la majorité de la variabilité des résultats.

En arrachage manuel, les indices et les taux de pourriture sont nuls ; alors qu'un développement selon une croissance microbiologique se dessine au cours du stockage avec un arrachage mécanique. Une seconde croissance exponentielle en fin de stockage est d'ailleurs observée avec un arrachage agressif.

Dans le cadre de ces essais, il est mis en valeur que les blessures de l'arrachage sont responsables du développement de pourriture. Comme évalué dans l'essai CLD d'Origny, un arrachage agressif engendre un taux de pourriture quatre fois plus élevé qu'un arrachage classique en fin de stockage. Comme mentionné dans la bibliographie, l'intensité des blessures de l'arrachage conditionne l'étendue des contaminations microbiologiques [Mumford and Wyse, 1976].

Le facteur durée est le second facteur impactant le développement de pourriture. Ici, la durée est reliée à la température, elle est dépendante du climat.

Autant dans l'essai conservation/variétés que dans l'essai CLD d'Origny, la variation du développement de pourriture est significative à partir de 350°j int (fin de la phase exponentielle). En moyenne, le taux de pourriture ou l'IP, est doublé par rapport à 250°j int (voir la correspondance entre IP et taux de pourriture en [annexe n°7](#)).

Cette observation rejoint les préconisations de Tereos concernant la règle des 250°j ext (à ne pas dépasser), correspondant aux 350°j int ([voir l'annexe n°1](#)). Au-delà de cette limite, les taux de pourriture seront au minimum doublés en fin de stockage, comparés à 350°j int. Comme mentionné dans la bibliographie, la capacité des racines à résister aux contaminations décline au cours du stockage [Bugbee, 1979].

Les estimations mentionnées ci-dessus sont vraies pour un arrachage classique. L'interaction arrachage/durée mesurée en année 2 de l'essai conservation/variétés et dans le cadre de l'essai CLD d'Origny est à prendre en compte.

Avec un arrachage agressif, le taux de pourriture est au minimum triplé à la fin de la première phase exponentielle, comparé à environ 350°j int. Et même si une phase de décélération

s'ensuit, une seconde phase de croissance exponentielle est déclenchée, entraînant un développement de pourriture deux fois plus important qu'à 350°j int ; et 4,5 fois plus important qu'un arrachage classique en fin de stockage.

Le travail de cartographie microbiologique de C. Meade suggère que différentes populations de pathogènes interviennent au cours du stockage, ce qui serait compatible avec plusieurs phases de croissances microbiologiques, comme observé dans l'évaluation du taux de pourriture de l'essai CLD d'Origny.

Le facteur variété voit son influence augmenter au cours du stockage. Des interactions avec les facteurs durée et arrachage témoignent des différences de comportements des variétés au cours du stockage.

C'est à partir de 350°j int que des classes différentes apparaissent, pour finir en fin de stockage par des différences significatives entre les 3 variétés étudiées sur les 2 années. Certaines variétés seraient plus sensibles au pourrissement que d'autres, et donc moins adaptées au stockage de longue durée. L'une des caractéristiques variétales pouvant expliquer ce phénomène serait la structure pariétale des racines. Chaque cellule végétale est entourée d'une paroi pectocellulosique, et en fonction de la composition de celle-ci, les variétés diffèrent en dureté. Plus la structure sera dense et compacte, plus dure sera la racine, et plus il sera difficile pour un pathogène d'y pénétrer.

Grâce aux résultats de l'année 2, cette hypothèse est vérifiée pour les deux variétés extrêmes. V2 avec une résistance physique élevée, a un faible développement de pourriture ; V1 avec une faible résistance physique, a un fort développement de pourriture. Pour V3, la tendance est moins nette car avec une forte résistance physique, le développement de pourriture est élevé.

En s'intéressant à l'analyse du marc et des fibres, on observe que les teneurs élevées de fraction insoluble correspondent aux fortes résistances physiques. En moyenne sur les deux années, la variété la plus résistante (V2) possède 10 % de fibres en plus que la moins résistante (V1). Cette différence ressort significative.

Sur le site de Lillers en année 2, une différence significative entre les deux types d'arrachages est relevée pour le gain en hémicellulose. L'arrachage mécanique cumule presque deux fois plus d'hémicellulose que l'arrachage manuel.

Le renforcement des structures par l'hémicellulose est relaté dans certains articles [Liu et al., 2016]. L'augmentation d'hémicellulose permet davantage de liaisons hydrogènes avec les micro-fibrilles de cellulose, assurant ainsi l'organisation de la paroi des racines. Elle pourrait correspondre en partie à l'augmentation des fibres au cours du stockage, et contribuer à la cicatrisation des blessures [Silveira et al., 2013].

Le rôle des fibres dans la résistance au pourrissement au cours du stockage est ici mis en valeur ; mais au regard des résultats de V3, d'autres éléments rentrent en jeu. Malgré une résistance physique élevée, cette variété possède un IP élevé en fin de stockage.

Un premier élément de réponse pourrait se dégager des résultats de pectines (autres constituants du marc avec les fibres).

En effet, la forte corrélation (positive) des pectines avec la résistance physique en début de stockage illustre leur contribution au renforcement des structures physiques des cellules. Et la

forte corrélation (négative) entre la concentration en pectines de début de stockage et l'IP de fin de stockage illustre leur participation à la résistance au développement de pourriture.

Les pectines sont les seuls éléments structuraux pour lesquels une corrélation significative est observée avec l'IP. Et en observant une faible teneur en pectines pour V3 en année 2 sur le site d'Origny, correspondant à un IP élevé, il est à supposer que les concentrations en pectines des variétés pourraient expliquer leur résistance à la pourriture.

De plus, l'évolution inverse des pectines au cours du stockage participe à l'identification de l'évolution du marc des racines. À la récolte, les blessures des racines se traduisent par des brèches dans la structure cellulaire. Le gel de pectines, liant les fibres entre elles, est endommagé. La diminution de la concentration des pectines au cours du stockage pourrait s'expliquer par leur dépolymérisation (action d'enzymes pectolytiques), provoquant une déstructuration des parois et conduisant au ramollissement des épidermes [Huber et al., 2001 ; Morris et al., 2010]. La dégradation des pectines est accentuée avec la durée du stockage et l'agressivité de la récolte.

Et finalement, le facteur lieu joue aussi son rôle sur le développement de la pourriture sur les racines pendant le stockage. En début de stockage, l'état sanitaire et la composition du sol des parcelles impactent la conservation des racines.

La nature du sol et sa composition jouerait donc un rôle sur la conservation des racines. Afin d'approfondir les connaissances sur les paramètres qui impactent la composition structurale des racines, des analyses du sol pourraient être prévues dans le cadre d'essais futurs. Le but serait de corrélérer les résultats de la composition minérale des racines avec leurs caractéristiques physiques.

Les récoltes doivent donc être optimisées afin d'obtenir un scalpage léger et de limiter les blessures, pour une meilleure conservation en silo des racines. Les recommandations passent tout d'abord par le respect de la date d'arrachage au regard de la date d'enlèvement du silo (limiter le cumul des températures en silo) ; et surtout, par des réglages machine adaptés à l'état du sol et non-agressifs, en prenant en compte les conditions météorologiques.

D'un point de vue méthodologique, l'analyse des pectines pourrait être optimisée afin d'approfondir la corrélation avec la résistance physique. Un protocole d'extraction et une méthode d'analyse pourraient être définis dans le but d'améliorer leur identification et leur quantification.

De plus, le test d'activités enzymatiques des polygalacturonases et des pectinméthylestérases permettrait d'en savoir plus sur le mécanisme de dégradation des pectines, et d'améliorer les connaissances sur les changements au cours du stockage.

Et l'évaluation quantitative de l'indice de pourriture pourrait s'accompagner d'une évaluation qualitative (aspect, couleur, texture) pour affiner la correspondance avec les espèces pathogènes identifiées dans la cartographie microbiologique.

Les changements physiques s'accompagnent de changements biochimiques, développés dans les paragraphes suivants.

B. Les changements biochimiques

C'est grâce à la méthode de la Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) que la majeure partie des analyses biochimiques a été réalisée.

❖ Validation de la méthode HPLC

Des difficultés ont été rencontrées dans la mise au point de cette méthode, notamment pendant la campagne 2015/2016.

C'est avec un détecteur ELSD et une colonne Prevail Carbohydrate ES qu'ont été initiées les analyses. C'est sur le principe de la lumière diffusée qu'était basée la détection. La colonne était constituée d'un gel de polymère hydrophile, robuste et adapté à la séparation des mono et oligosaccharides. La ligne de base du chromatogramme n'était pas stable, avec une faible reproductibilité des mesures. Le calibrage devait être journalier, et le temps d'analyse par échantillon était d'une heure. En comparant avec les résultats des mesures par polarimétrie, les écarts étaient conséquents. La méthode d'analyse a donc été améliorée en année 2 (inter-campagne 2016), et les résultats des mesures HPLC ont alors pu être exploités pour les résultats de la campagne 2016/2017.

Dans la partie M&M de ce chapitre, il est mentionné l'impact des hexoses, du glucose notamment, sur les mesures du polarimètre (augmentation des valeurs de richesse). Les résultats des analyses physiques ont démontré l'impact de la durée de stockage sur l'augmentation de la pourriture. Comme vu dans la bibliographie, les contaminations augmentent la production d'hexoses. Dans le cadre des essais de stockage longue durée, les prélèvements de fin de stockage sont donc impactés dans leurs mesures de richesse au polarimètre. Les richesses obtenues sont plus élevées que les richesses réelles, en raison du pouvoir rotatoire dextrogyre du glucose.

Avec l'HPLC, ce problème ne se pose pas. Comme les molécules sont mesurées individuellement, les valeurs de saccharose ne sont pas biaisées par les autres sucres. En s'intéressant à la corrélation entre les résultats de polarimétrie et d'HPLC, il est observé des valeurs plus élevées par polarimétrie que par HPLC. En représentant cette corrélation en fonction des IP, il est observé des écarts plus importants avec des taux de pourriture élevés (supérieurs à 4 % ; voir la figure n°56).

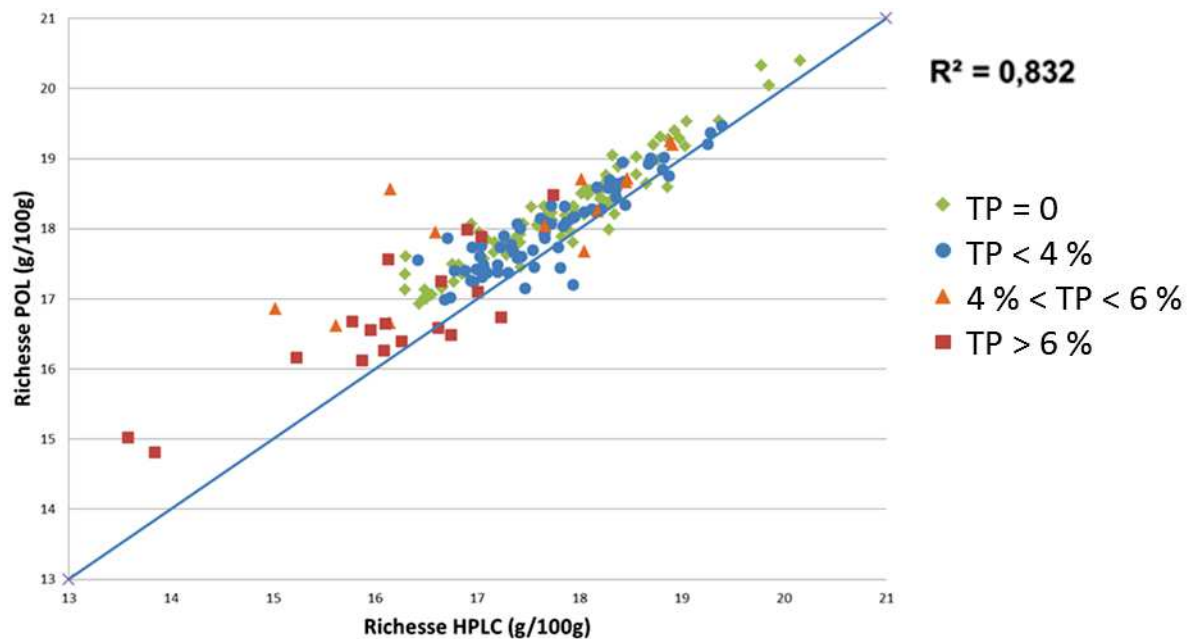


Figure n°56 : Corrélation entre les résultats des mesures de richesse par polarimétrie et par HPLC en fonction de l'indice de pourriture.

TP ↔ Taux de pourriture.

Regroupement de l'essai conservation/variété et CLD d'Origny.

La bissectrice représente l'égalité entre les mesures par polarimétrie et par HPLC.

Plus l'IP est élevé, plus l'écart entre les deux méthodes est important.

Une comparaison entre la méthode HPLC et la colorimétrie pour les mesures de glucose a également été faite.

Le colorimètre de laboratoire est calibré sur une gamme définie de concentrations de glucose ; et une gamme limitée, de façon à maintenir la précision de la mesure. Si un échantillon a une concentration en glucose non comprise dans la gamme définie, la mesure ne sera pas enregistrée.

Avec l'HPLC, la calibration peut être faite sur une gamme de concentrations plus large, tout en conservant la précision de la mesure. Et même si la concentration en glucose est « hors gamme », la mesure reste accessible (via le chromatogramme). Il suffira d'ajuster la calibration avec des standards pour calculer la concentration en glucose de l'échantillon. Et comme pour le saccharose, avec l'HPLC il y a la certitude de ne mesurer que la concentration de la molécule de glucose, sans interférence d'impuretés ou d'autres molécules.

En s'intéressant à la corrélation entre les mesures par colorimétrie et par HPLC, à l'inverse du polarimètre, des valeurs inférieures à celles de l'HPLC sont mesurées par colorimétrie (limite de la méthode : saturation). En représentant cette corrélation en fonction des taux de pourriture, comme avec la polarimétrie, il est observé des écarts plus importants avec des taux de pourriture élevés (supérieurs à 4 % ; voir la figure n°57).

En s'appuyant sur le principe de la méthode HPLC (séparation des molécules), et en connaissant les limites des méthodes de polarimétrie et colorimétrie (impactées par le développement de pourriture), l'HPLC a été privilégiée dans le cadre de la thèse. Cette méthode a permis de calculer plus précisément les concentrations en saccharose et glucose ;

d'accéder aux concentrations d'autres molécules (comme la bétaine et le fructose) ; et d'identifier d'autres sucres (voir le chapitre 3).

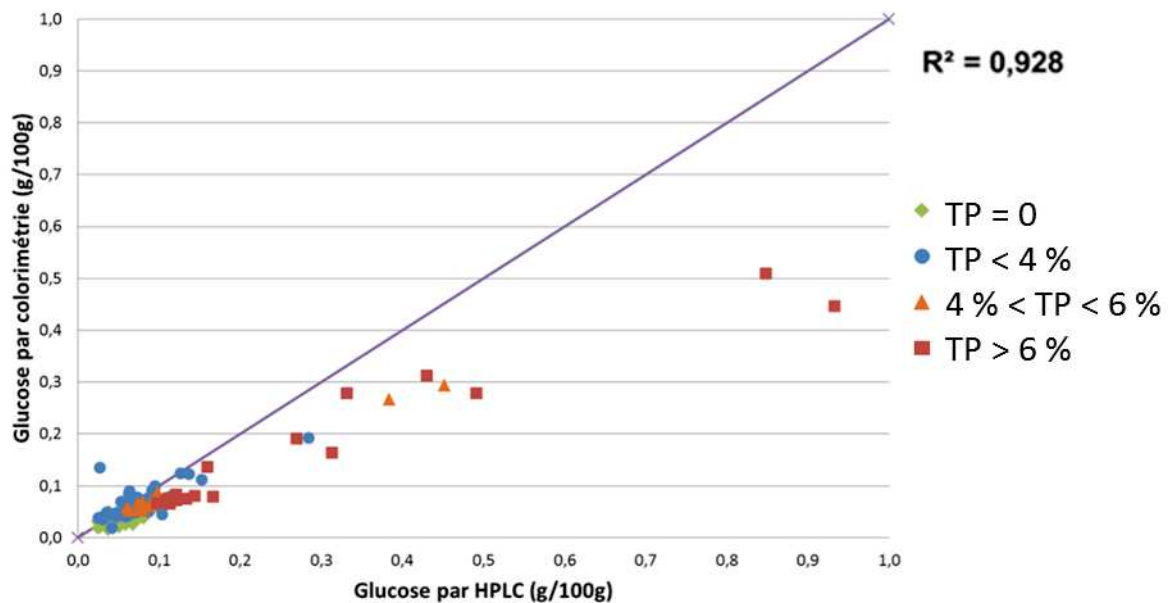


Figure n°57 : Corrélation entre les résultats des mesures de glucose par colorimétrie et par HPLC en fonction de l'indice de pourriture.

TP ↔ Taux de pourriture.

Regroupement de l'essai conservation/variété et CLD d'Origny.

La bissectrice représente l'égalité entre les mesures par colorimétrie et par HPLC.

Plus l'IP est élevé, plus l'écart entre les deux méthodes est important.

a. Saccharose (HPLC et polarimétrie)

i. Essai conservation/variétés

Pour le stockage en chambre de l'année 1, des pertes de richesse inattendues sont mesurées à 250°j int et 350°j int : 7 % de pertes comparées à J0 ; alors que les pertes mesurées à 450°j int sont d'environ 5 %. En raison de résultats inexploitable dans le cadre de cet essai, les résultats en chambre ne seront pas traités ici.

Pour ce qui est du stockage en silo, avec un arrachage mécanique il est mesuré une perte de richesse moyenne de 12 % en fin de stockage, comparée à J0.

Les richesses sont plus élevées sur le site de Lillers que sur le site d'Origny (en moyenne de 3,4 %).

Globalement, V3 et V1 sont significativement différentes sur les deux sites ; V2 appartient à une autre classe avec V4 et V5 sur Lillers ; et seulement avec V4 sur Origny. Comme attendu, V3 est la variété la plus riche (cf. tableau n°4). En raison d'un facteur variété prédominant sur le facteur lieu, les richesses moyennes du regroupement des 2 sites sont illustrées en figure n°58.

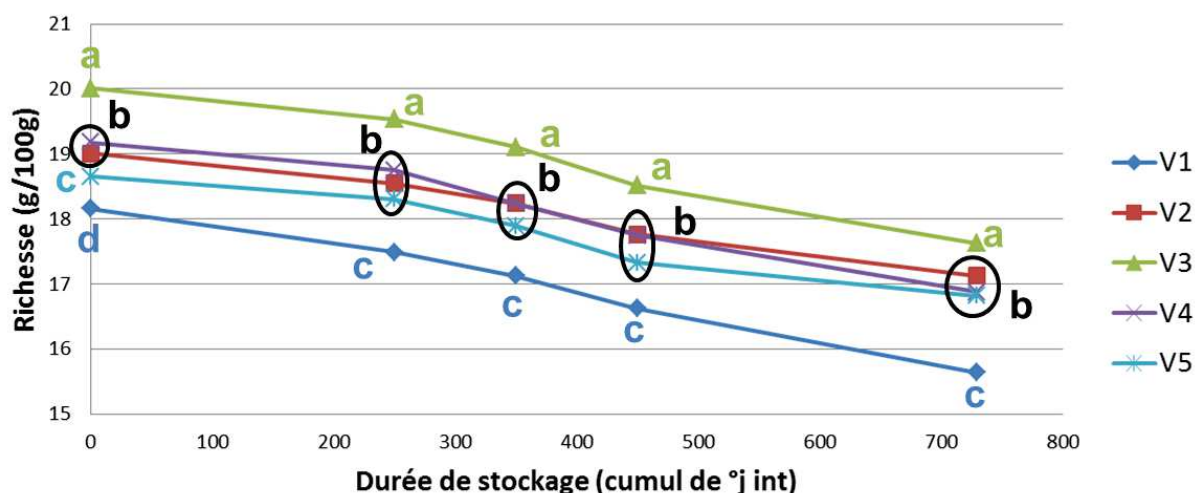


Figure n°58 : Évolution de la concentration en saccharose (richesse) en fonction de la variété – Essai conservation/variétés - Année 1 (polarimétrie) – 2 sites – Arrachage mécanique.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En année 1 (résultats des mesures polarimétriques), il est retrouvé un effet durée prédominant sur les résultats de richesse (49 %) ; ensuite un effet variété (35 %), et un effet lieu (8 %).

En fin de stockage, le facteur variété est prédominant (56 %). Les facteurs lieu et arrachage apparaissent aussi significatifs (respectivement 13 % et 9 %).

Concernant les pertes en sucre (voir la formule mathématique dans le M&M), en arrachage mécanique V1 et V3 enregistrent les pertes en sucre les plus importantes, et significativement différentes de V5 (voir la figure n°59). V1 perd environ 0,62 g/100g de saccharose en plus que V5 et V2 en fin de stockage.

Comparées à J0 (le jour de la récolte), les pertes sont multipliées par 4 pour un arrachage mécanique en fin de stockage ; par 1,4 pour un arrachage manuel (voir la figure n°60).

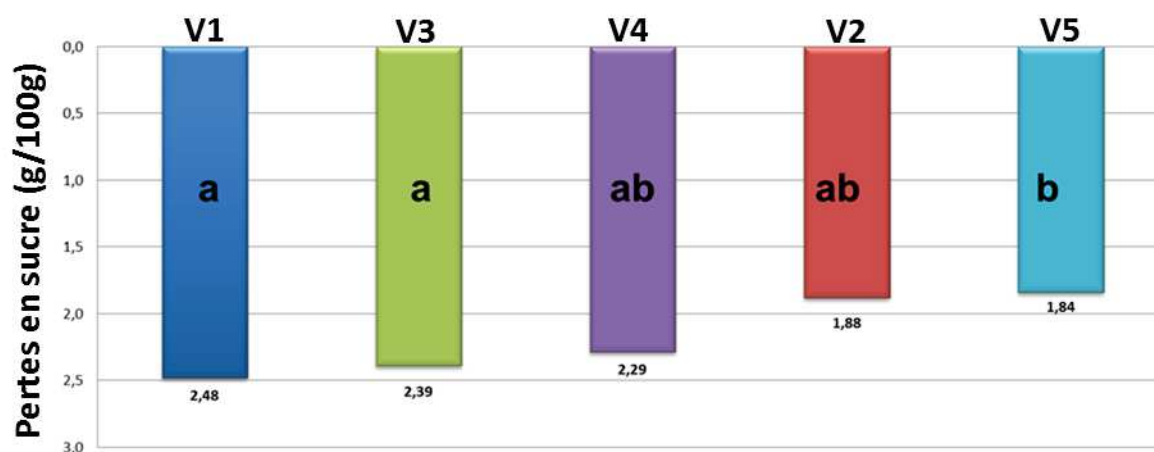
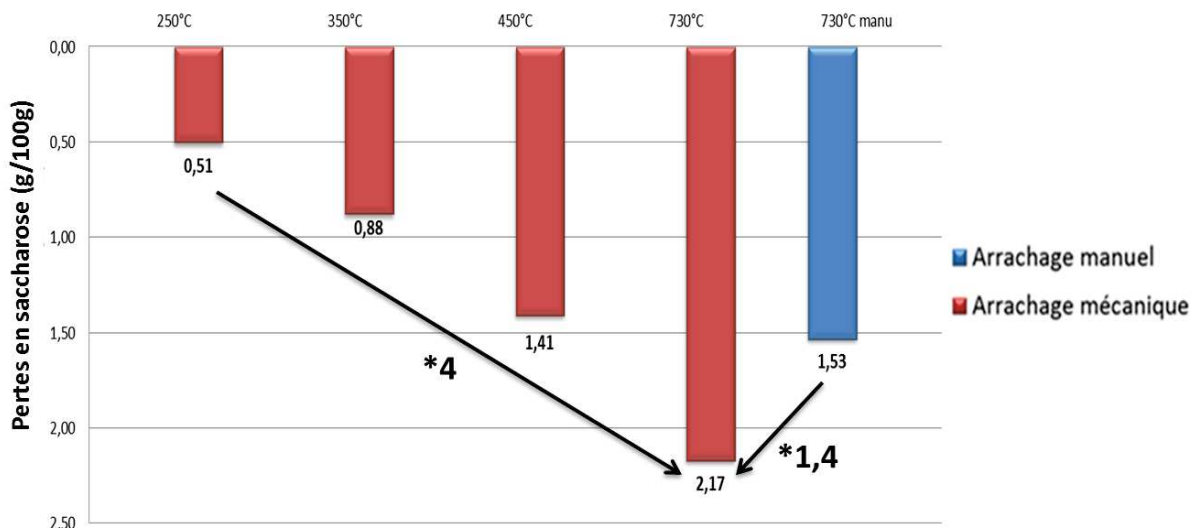


Figure n°59 : Pertes en sucre par variété en fin de stockage – Essai conservation/variétés – Arrachage mécanique – Année 1.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.



**Figure n°60 : Pertes en saccharose au cours du stockage – Essai conservation/variétés - Année 1 (polarimétrie).
Regroupement des 5 variétés et des 2 lieux.**

C'est également le facteur durée qui est prédominant pour les pertes en sucre (78 %).

En fin de stockage, le facteur arrachage est prédominant (36 %) ; ensuite le facteur variété (15 %).

La variété la plus riche (V3) et la variété la plus sensible à la pourriture (V1) sont celles qui perdent le plus de saccharose au cours du stockage. Contrairement aux variétés résistantes à des maladies spécifiques (*R. solani* pour V2 ou aux nématodes pour V5), qui enregistrent le moins de pertes en saccharose. Des différences métaboliques sont suggérées ici.

Il est à supposer que les variétés résistantes sont équipées de métabolites spécifiques, impliqués dans la défense de la racine, qui limiteraient l'utilisation du saccharose des cellules de stockage ; alors que V3 et V1, dépourvues de ces métabolites, puiseraient dans leurs ressources en saccharose pour lutter contre les agressions extérieures. Dans cet essai, V3 est la variété la plus riche, du début à la fin de stockage, malgré ses pertes importantes. Il serait intéressant de mesurer ces pertes en présence de rhizoctone brun, ou de nématodes, pour évaluer la pertinence de l'utilisation de V2 et V5 dans le maintien de richesses intéressantes en fin de stockage de longue durée, à partir de parcelles malades.

En année 2, ce sont les résultats des analyses HPLC qui ont été utilisés.

Une diminution de la richesse est observée au cours du stockage (6 % en moyenne pour V1 et V2 ; 8 % pour V3, entre le jour de la récolte et la fin du stockage).

Concernant le classement des variétés, V3 est significativement différente des deux autres variétés tout au long du stockage sur Lillers (variété la plus riche, comme en année 1). Sur Origny, les 3 variétés appartiennent à des classes différentes en début de stockage ; en milieu de stockage, V3 est statistiquement différente des deux autres variétés ; et en fin de stockage, V2 rejoint la classe de V3 (voir figure n°61).

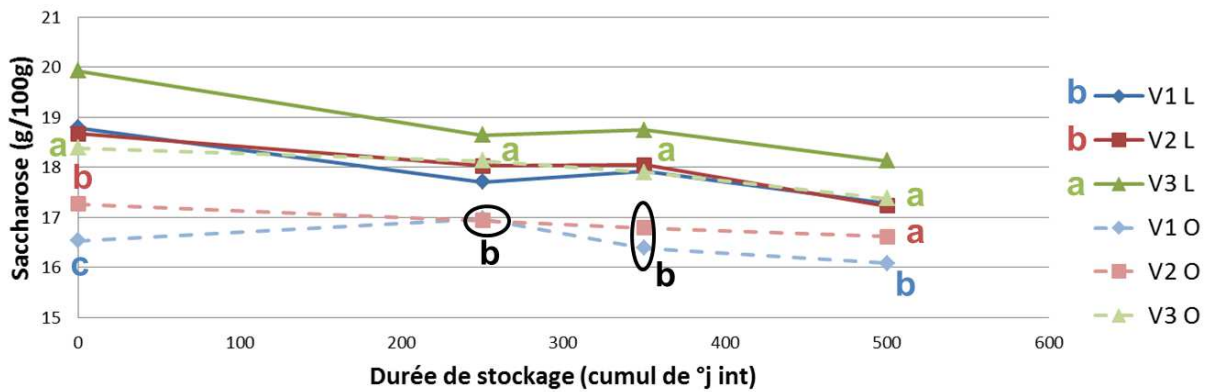


Figure n°61 : Évolution des concentrations en saccharose au cours du stockage par variété en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Année 2 (HPLC).

L → site de Lillers : classes des variétés indiquées dans la légende.

O → site d'Origny : classes des variétés indiquées sur la figure.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Les richesses sont plus élevées sur le site de Lillers, comme en année 1 (de 6,2 % en moyenne, comparé au site d'Origny). Il est à supposer ici que le sol de Lillers serait plus favorable au stockage du saccharose dans les vacuoles des cellules des racines que le sol d'Origny. Comme mentionné dans la bibliographie, le potassium serait impliqué dans le stockage du saccharose dans les racines. En [annexe n°18](#), un travail de recherche sur les bénéfices apportés par un apport en potassium est rapporté. Ce minéral pourrait être plus facilement disponible dans la région Nord-Pas-de-Calais (Lillers) que dans la région de l'Aisne (Origny).

Les facteurs lieu (32 %), variété (28 %) et durée (18 %) sont prédominants sur la richesse.

Concernant les pertes en saccharose, en moyenne avec un arrachage mécanique, une perte de 1,4 g/100g est mesurée en fin de stockage en année 2. Pour un arrachage manuel, les pertes sont en moyenne de 1,1 g/100g en année 2.

En année 2, les pertes sont plus importantes sur le site de Lillers (27 % en plus que sur le site d'Origny). À noter que les conditions d'arrachage ont été difficiles (fortes pluies → betteraves enrobées de terre), et que la sortie à 350°j s'est déroulée sous la pluie également. Un biais dans les mesures de poids a donc pu être créé, ce qui expliquerait en partie les pertes importantes enregistrées en arrachage manuel ; et probablement, l'effet arrachage faiblement significatif au cours du stockage.

Si l'on compare les pertes sur les 2 années, malgré l'imprécision relative pour les mesures polarimétriques, elles ont été plus importantes en année 1 (voir la figure n°62). Cette tendance peut s'expliquer par un effet année, avec des conditions climatiques différentes. En effet, en année 1, les 730°j ont été atteints mi-décembre (alors que les 630°j de la seconde année ont été atteints mi-janvier, pour une date de récolte similaire). L'augmentation des températures dans les silos a été plus rapide en année 1, les silos étaient plus chauds, ce qui peut expliquer les pertes en sucre plus importantes.

Et avec l'expérience de la récolte de l'année 1, davantage de précautions ont été prises pour la seconde année, autant pour l'arrachage manuel que mécanique (moins de blessures).

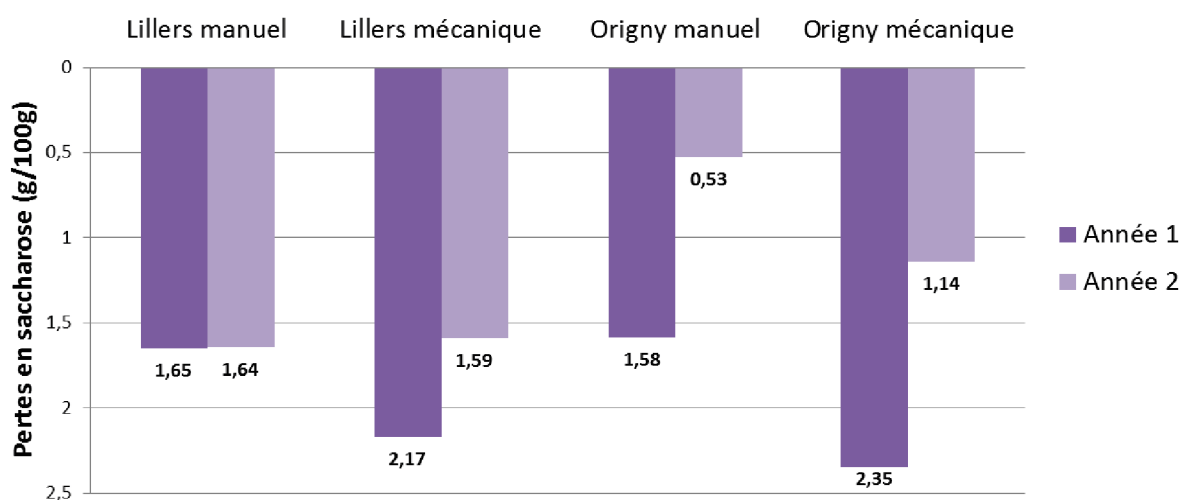


Figure n°62 : Pertes en saccharose à 500j int en fonction du lieu, de l'arrachage et de l'année – Essai conservation/variétés des 2 années
Regroupement des 3 variétés.

Le facteur durée est également prédominant pour les pertes en saccharose de l'année 2 (48 %). Ensuite intervient le facteur lieu (8 %) et l'interaction durée/arrachage (6 %).

En fin de stockage, les facteurs lieu et arrachage sont prédominants (respectivement 32 % et 31 %). En raison d'un facteur variété non significatif, les pertes des trois variétés ont été regroupées (voir la figure n°62).

Sur les deux années, il est souligné l'impact du facteur arrachage en fin de stockage, retrouvé dans la majorité des mesures. Plus les racines sont blessées, plus les pertes en sucre sont conséquentes. Le soin apporté à la récolte est essentiel pour optimiser le stockage de longue durée et limiter les pertes en sucre.

Le facteur lieu ressort également significatif. Il met en valeur l'importance des conditions de récolte, notamment de la météorologie. Comme mentionné précédemment, la récolte de Lillers s'est déroulée en conditions difficiles, et peut également expliquer des pertes en saccharose supérieures au site d'Origny.

Pour faire le lien entre les caractéristiques du sol et les résultats de fin de stockage, les données de concentration des minéraux devront être traitées, et d'autres analyses du sol devraient être envisagées.

ii. Essai CLD d'Origny

Pour l'essai CLD d'Origny, les résultats de mesures HPLC sont également rapportés ici.

La richesse initiale est de 17,6 %.

Des différences significatives avec l'arrachage manuel sont relevées. En semaine 4 pour l'arrachage classique ; en semaines 4 et 8 pour l'arrachage agressif.

À noter ici que même en l'absence de blessures (arrachage manuel), les racines ont une richesse qui diminue au cours du stockage (voir la figure n°63). Grâce aux considérations des pertes de poids, le gain en eau qui occasionnerait une dilution est exclu dans l'explication de

ce phénomène. En l'absence de pourriture, les racines consommeraient leur saccharose pour maintenir leur métabolisme de base (respiration notamment). Comme constaté précédemment dans les résultats de cet essai, il n'y a pas de différences significatives entre l'arrachage classique et la modalité chaulage.

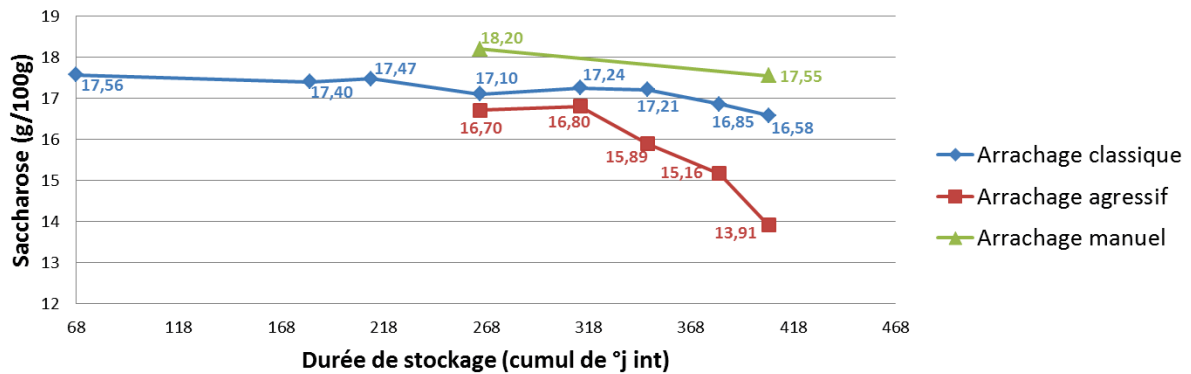


Figure n°63 : Évolution des concentrations en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Résultats de l'essai CLD d'Origny.

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Les facteurs arrachage et durée sont significatifs pour la mesure de la concentration en saccharose (respectivement 39 % et 31 %). L'interaction de ces deux facteurs apparaît significative également (9 %).

Entre un arrachage classique et agressif, les richesses sont significativement différentes à partir de la semaine 6 (314°j int). En se référant aux résultats de taux de pourriture et d'hexoses de cet essai, ce point de prélèvement correspond à la fin de la phase exponentielle de la croissance microbologique, et à l'augmentation de la production d'hexoses.

Pour les pertes de saccharose, 0,45 g/100g sont enregistrées avec un arrachage manuel en fin de stockage (valeur similaire à la perte enregistrée sur le site d'Origny en année 2 dans l'essai conservation/varieties pour un arrachage manuel). En se référant aux IP, il est observé que ces pertes ne sont pas dues au développement de pourriture. Les racines consomment donc leur propre saccharose au cours du stockage pour fournir l'énergie nécessaire à leurs cellules.

Une perte de 1,01 g/100g de saccharose est mesurée en fin de stockage avec un arrachage classique.

La perte est de 3,51 g/100g avec un arrachage agressif ; soit 3,5 fois plus de pertes en saccharose qu'avec un arrachage classique ; et presque 8 fois plus qu'avec un arrachage manuel (voir figure n°64).

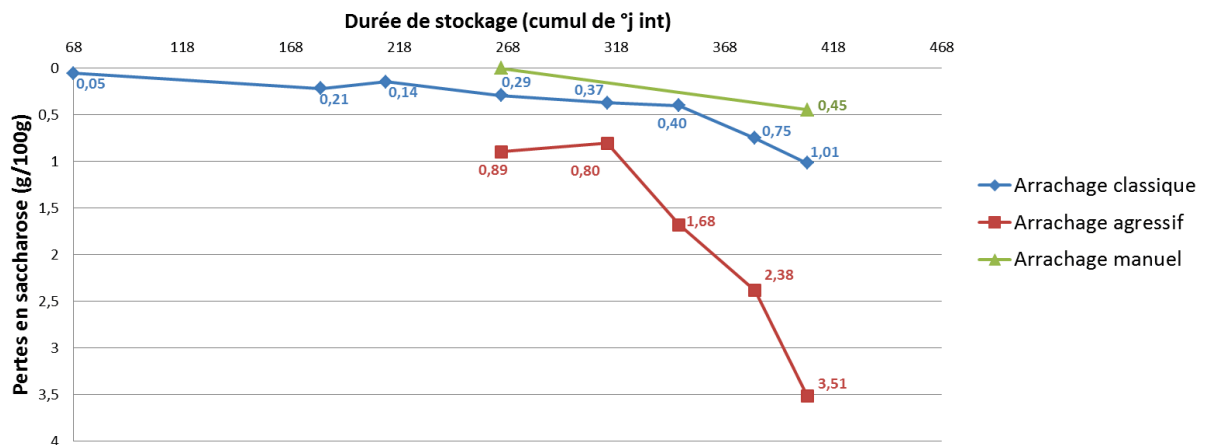


Figure n°64 : Évolution des pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Résultats de l'essai CLD d'Origny.
Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Comme observé dans l'essai conservation/variétés, le facteur durée explique la majeure partie de la variabilité des mesures (38 %). Dans cet essai, le facteur arrachage est également significatif (31 %).

Les pertes ne sont pas significativement différentes d'une durée de stockage à l'autre pour les arrachages classique et manuel. Elles apparaissent cependant significativement différentes entre 314°j int et la fin de stockage (406°j int) pour l'arrachage agressif.

Les pertes sont significativement différentes entre les arrachages manuel et agressif ; et entre les arrachages classique et agressif à partir de 347°j int. Il n'y a pas de différence significative entre les pertes de saccharose des arrachages manuel et classique en semaines 4 et 8.

Ces observations rejoignent les précédentes, et confortent le lien avec la croissance microbologique. Les pertes en saccharose sont accentuées à partir de 314°j int pour l'arrachage agressif ; à partir de 347°j int pour l'arrachage classique. De 347°j int à 382°j int, une légère phase de décélération se devine pour l'arrachage agressif. Et de 382°j int à la fin du stockage, une seconde phase de pertes pour l'arrachage agressif est mesurée (seconde population microbologique).

En s'intéressant à la corrélation entre le développement de pourriture et les pertes en saccharose, il est observé que ces deux mesures sont liées. Plus il y a de pourriture, plus les pertes en saccharose sont importantes (voir la figure n°65).

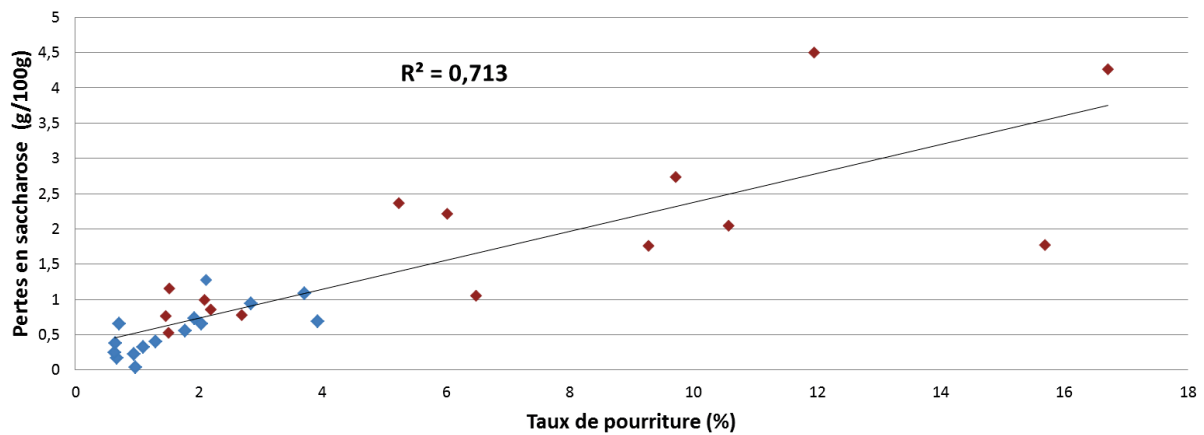


Figure n°65 : Corrélation entre le développement de pourriture et les pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage – Essai CLD d'Origny - De 212°j int à 406°j int.

Arrachage classique ↔ points bleus.

Arrachage agressif ↔ points rouges.

La consommation du saccharose est accentuée avec les blessures de l'arrachage. En présence de blessures, les contaminations microbiologiques sont facilitées ; le saccharose est alors utilisé par les pathogènes pour leur propre développement, conduisant éventuellement à la synthèse d'autres sucres, adaptés aux métabolismes des pathogènes tels que le glucose et le fructose (voir le chapitre 3).

Les racines peuvent également consommer leur propre saccharose. En plus de la respiration, pour maintenir leur métabolisme, elles peuvent utiliser leurs réserves énergétiques pour lutter contre les contaminations, pour la synthèse de métabolites de défense notamment. L'induction de la production d'enzymes de dégradation des parois extracellulaire des champignons (chitinase et glucanase), ou d'enzymes régulatrices du stress oxydatif (peroxydases) pourraient également être à l'origine de l'augmentation de la consommation du saccharose, observée en arrachage agressif et en fin de stockage [Dumas-Gaudot et al., 1992 et 1996 ; Kasprzewska, 2003 ; Sahai and Manocha, 1993].

b. Hexoses

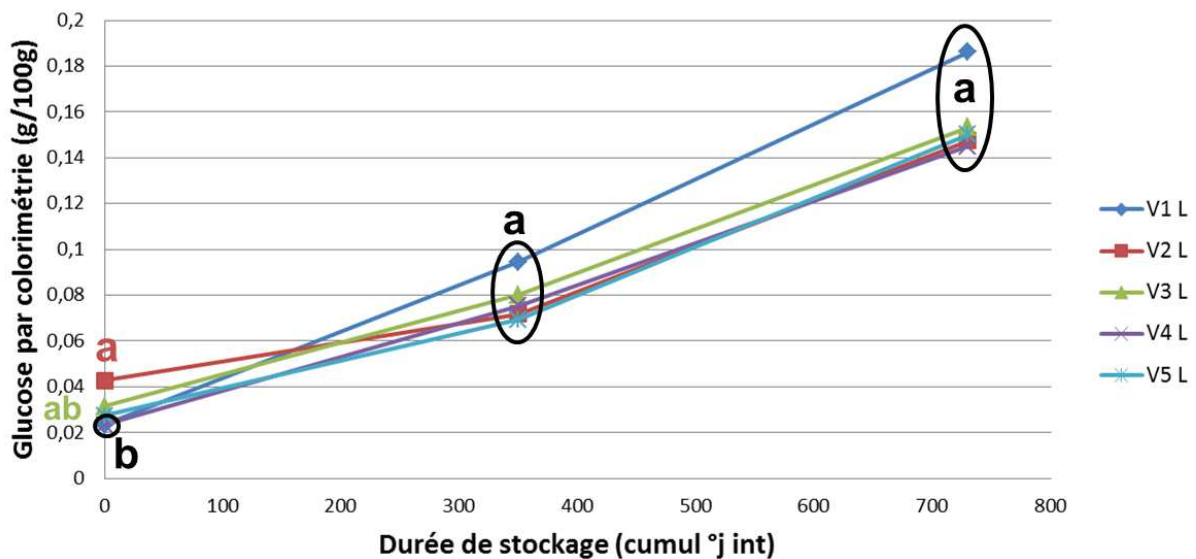
i. Essai conservation/variétés

En année 1, c'est la méthode colorimétrique qui a été utilisée (la méthode HPLC a été mise au point en 2016, après la 1^{ère} année du projet). Seul le glucose a donc été évalué en année 1 ; et uniquement les échantillons à J0, de milieu (350°j int) et de fin de stockage (730°j int) ont été analysés.

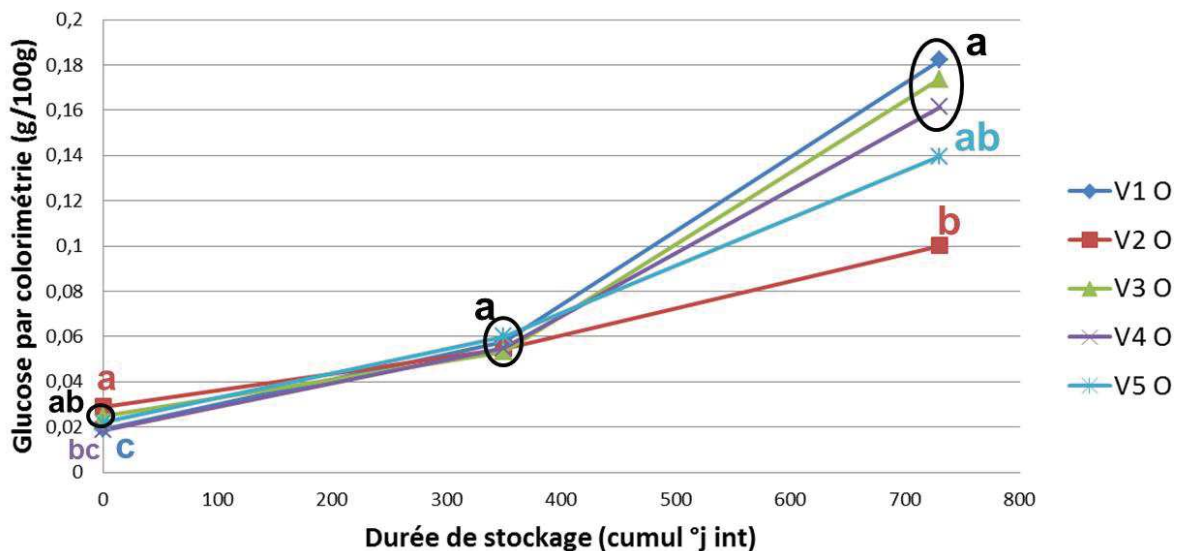
En chambre (arrachage manuel), les concentrations en glucose restent faibles du début à la fin du stockage (inférieures à 0,05 g/100g). Pour les raisons mentionnées précédemment, le stockage en chambre ne sera pas développé ici.

Pour le stockage en silo (arrachage mécanique), c'est sur le site de Lillers que les concentrations en glucose sont les plus élevées ; en moyenne, 1,3 fois plus de glucose comparé à Origny. Cette observation est à relier à celle de l'IP. En année 1, c'est sur le site de Lillers que le développement de pourriture est le plus important (cf. résultats d'IP).

Une augmentation des concentrations en glucose est observée au cours du stockage (en moyenne, 5 fois plus de glucose en fin de stockage comparé à J0 ; voir les figures n°66a et n°66b).



a) Lillers (Figure n°66)
L ↔ Lillers



b) Origny
O ↔ Origny

Figure n°66 : Évolution des concentrations en glucose au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés - Année 1 – Arrachage mécanique - Méthode colorimétrique.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

En fin de stockage, la concentration en glucose est en moyenne 2,5 fois plus élevée avec un arrachage mécanique comparé à un arrachage manuel (voir la figure n°67). Les blessures sur les racines, engendrées par l'arrachage mécanique, représentent des portes d'entrée pour les pathogènes. Au cours du stockage, la pourriture se développe et serait à l'origine de l'augmentation des concentrations en hexoses.

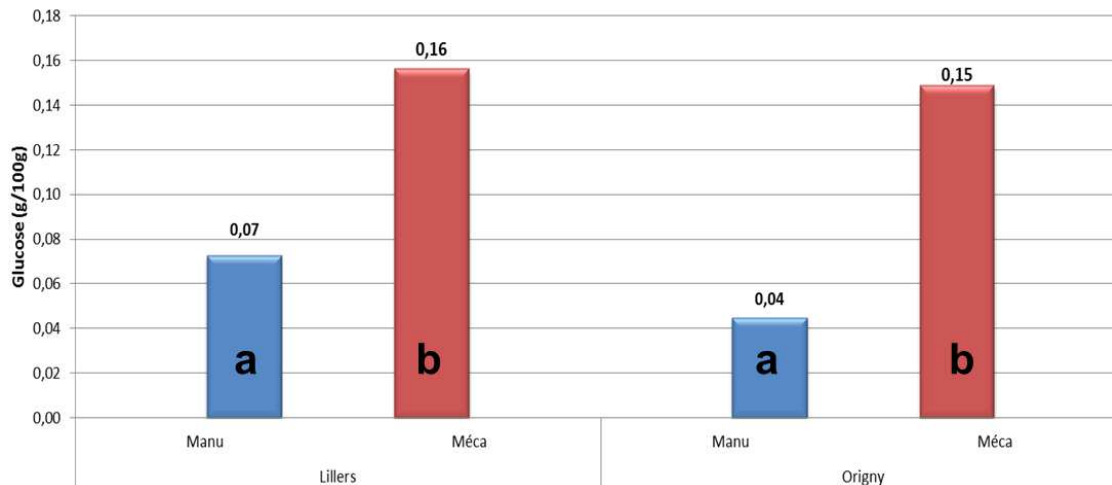


Figure n°67 : Concentration en glucose en fin de stockage en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 1/Méthode colorimétrique.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

À la récolte, V2 a la concentration en glucose la plus élevée (en moyenne 1,6 fois plus élevée que les autres variétés ; voir les figures n°66a et n°66b). Cette observation traduit une différence métabolique de cette variété, comparé aux autres. À rappeler que V2 est une variété résistante au champignon *R. solani* (voir le tableau n°4). L'hypothèse qui peut être faite serait une mise à disposition du glucose plus importante que chez les autres variétés au cours du développement de la plante de façon à alimenter la synthèse de molécules ou la mise en place de mécanismes de défense, caractéristique de cette résistance (ce qui expliquerait également la « faible richesse » de V2, 0,8 pt de différence comparé à une variété riche). À noter que cette observation est caractéristique du développement de la plante ; et non pas du comportement en stockage. Au regard des figures n°66a et n°66b, V2 ne maintient pas une concentration en glucose élevée ; d'autres facteurs interviennent, notamment la résistance à la pourriture.

C'est le facteur durée qui est prédominant sur la mesure de glucose pour un stockage silo avec un arrachage mécanique (responsable de 79 % de la variabilité des mesures).

À J0, les facteurs variété et lieu sont prédominants (respectivement 32 % et 30 %). Une interaction variété/lieu est mesurée (6 %).

En milieu de stockage (350°j int), seul le facteur lieu est significatif (31 %). Il n'y a pas de différences significatives entre les variétés.

Et en fin de stockage, c'est le facteur arrachage qui est prédominant (69 % ; en année 1, ce facteur n'a été évalué qu'en fin de stockage).

Il n'y a pas de différence significative entre les variétés sur le site de Lillers en fin de stockage (voir la figure n°67a) ; contrairement à Origny où V2 a la concentration la plus faible en fin de stockage et est significativement différente des variétés V1, V3 et V4 (voir la figure n°67b).

L'augmentation de la concentration en glucose au cours du stockage rejoint celle de la mesure d'IP. Comme vu dans la bibliographie, une corrélation pourrait exister entre le développement de pourriture et la concentration en glucose. Cette corrélation est mesurée dans le chapitre 3. Les pathogènes utilisent le sucre présent dans les racines, cependant, leur métabolisme n'est pas adapté pour métaboliser directement la molécule de saccharose. De ce fait, les pathogènes activent des invertases pour hydrolyser le saccharose et utiliser le glucose et le fructose qui résultent de l'hydrolyse. L'augmentation des IP au cours du stockage pourrait donc expliquer l'augmentation des concentrations en glucose.

Grâce à la méthode HPLC mise au point en année 2, les évolutions des concentrations de glucose et de fructose ont pu être mesurées au cours du stockage.

Pour ces deux mesures, les limites de détection de l'équipement ne sont pas loin d'être atteintes (part de résiduelle non-expliquée avoisinant les 50 % dans l'analyse de la variance).

La production d'hexoses est quasiment nulle avec un arrachage manuel. Les variations observées en figure n°68 sont considérées comme liées à l'imprécision de la mesure (concentrations faibles).

Comme en année 1, avec un arrachage mécanique c'est une augmentation des concentrations en hexoses qui est mesurée (voir la figure n°68). L'hypothèse selon laquelle les blessures seraient à l'origine de la production d'hexoses est ici confortée.

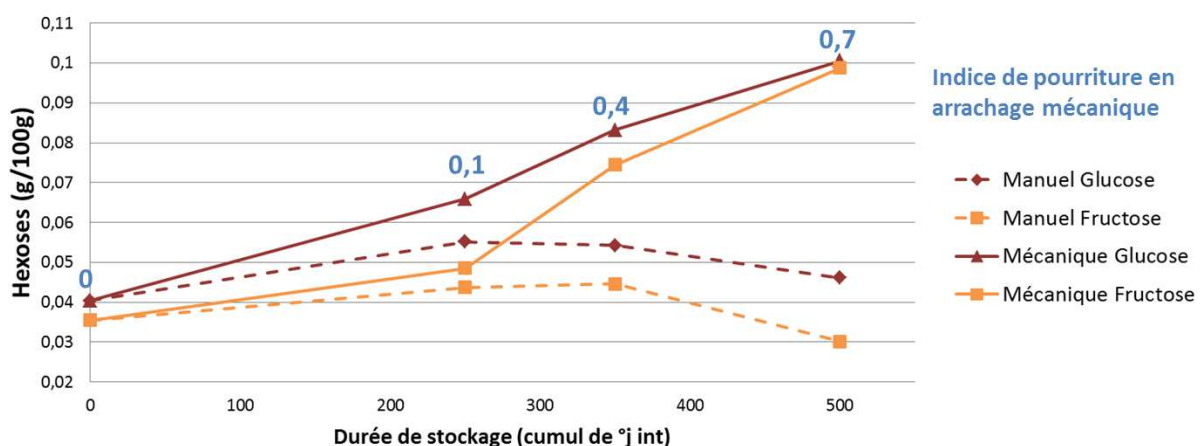


Figure n°68 : Évolution des hexoses au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des 3 variétés et des 2 lieux.

Production de glucose et de fructose en lien avec l'indice de pourriture.

L'IP est considéré nul en arrachage manuel.

Si l'on s'intéresse à la concentration en glucose des variétés en fin de stockage (paramètre suivi préférentiellement au fructose au laboratoire agronomique), V1 se distingue significativement des autres. Sa concentration en glucose est multipliée par 4 par rapport à la concentration initiale (variété sensible à la pourriture). Les concentrations de V2 et V3 sont en moyenne doublées (voir la figure n°69).

Les différences variétales sont plus marquées en début de stockage sur le site de Lillers ; et en fin de stockage sur le site d'Origny, où les IP ont été plus élevés en année 2. Le comportement des variétés reste comparable d'un site à l'autre (d'où le regroupement des deux sites pour la figure n°69).

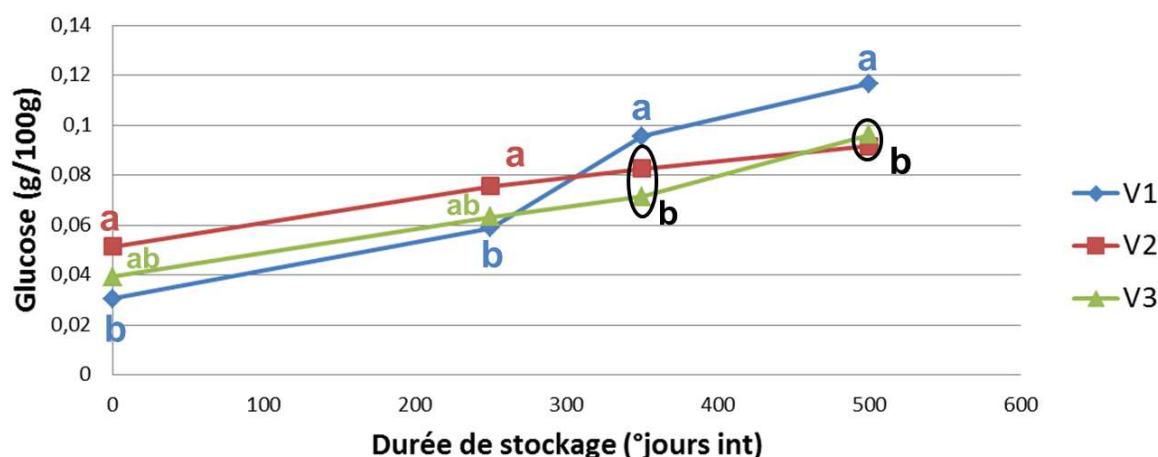


Figure n°69 : Évolution des concentrations en glucose au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés - Année 2 – Arrachage mécanique (Regroupement des 2 lieux).

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

C'est le facteur arrachage qui est prédominant pour les deux mesures (24 % pour le glucose et 25 % pour le fructose). Ensuite, le facteur durée et l'interaction durée/arrachage (pour le glucose, la durée explique 17 % de la variabilité et l'interaction 16 % ; pour le fructose, l'interaction 21 % et la durée 8 %).

En année 1, le facteur arrachage n'avait pas été évalué au cours du stockage, uniquement en fin de stockage, où il apparaît prédominant pour la mesure de glucose (fructose non mesuré). De ce fait, le facteur durée est responsable de la majeure partie de la variabilité au cours du stockage en année 1. En ne travaillant qu'avec un arrachage mécanique en année 2, le facteur durée devient prédominant (37 %) ; ensuite le facteur lieu et l'interaction durée/lieu (6 % chacun) ; et le facteur variété (5 %).

Jusqu'à 250j int, les concentrations en glucose sont plus élevées sur le site de Lillers ; à partir de 350j int, elles sont plus importantes sur le site d'Origny (IP plus élevé sur le site d'Origny).

Le parallèle avec la croissance microbologique, vu avec les mesures d'IP et de taux de pourriture, peut être suggéré ici également (voir la figure n°62, avec l'indication des IP correspondant aux points de prélèvement, en bleu).

De J0 à 250°j int, c'est la phase de latence. De 250°j int à 350°j int, c'est la phase exponentielle de croissance microbologique, suggérée sur la figure n°62 par l'allure des courbes des concentrations en glucose et fructose en arrachage mécanique (courbes pleines). Comparées à J0, les concentrations en hexoses sont en moyenne doublées à 350°j int. Au-delà des 350°j int, la phase de décélération est marquée par une augmentation plus progressive des concentrations en hexoses, à lier à l'augmentation plus progressive également du développement de pourriture (voir le chapitre 3 pour la corrélation entre la concentration en hexoses et l'IP).

ii. Essai CLD d'Origny

Comme reporté dans l'essai conservation/variétés, la production d'hexoses est significativement réduite en absence de blessures (arrachage manuel).

Avec un arrachage agressif, les concentrations en hexoses augmentent plus rapidement. Comparée à un arrachage classique, la concentration en hexoses est presque multipliée par 4 à partir d'un cumul de 382°j int (voir la figure n°70).

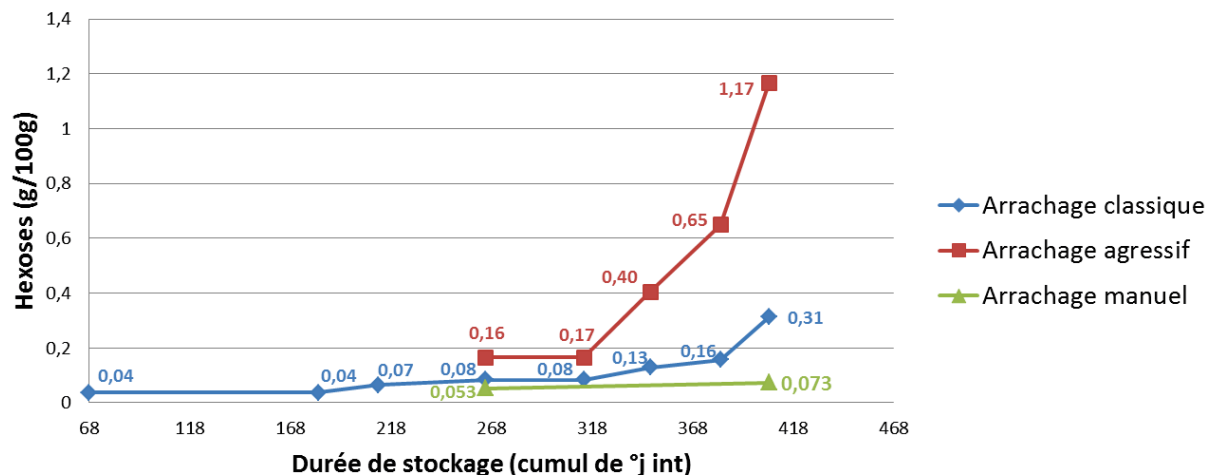


Figure n°70 : Évolution de la concentration en hexoses au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Comparées à 350°j int, les concentrations en hexoses de fin de stockage sont multipliées par 2,4 pour un arrachage classique ; par 3 pour un arrachage agressif. Et si l'on compare les concentrations à 350°j int avec les concentrations à la semaine 4 (265°j int), elles sont presque multipliées par 2 pour un arrachage classique (comme observé dans l'essai conservation/variétés) ; par 2,5 pour un arrachage agressif (interaction durée/arrachage). Comme dans l'essai conservation/variétés, le parallèle avec la croissance microbologique (et l'IP) est retrouvé ici, à des cumuls de températures comparables.

Jusqu'à 314°j int, c'est la phase de latence ; de 314°j int à 347°j int, c'est la phase de croissance exponentielle (plus marquée en arrachage agressif) ; et de 347°j int à 382°j int, la phase de décélération, moins marquée, voire inexistante en arrachage agressif.

Dans cet essai, une seconde phase d'augmentation des concentrations en hexoses est mesurée de 382°j int à la fin de stockage (concentrations multipliées par 2 pour les deux types d'arrachages). Cette seconde augmentation peut être assimilée à une seconde croissance exponentielle des pathogènes, retrouvée dans la mesure des IP (voir les résultats d'IP de l'essai CLD d'Origny). L'hypothèse de la croissance d'une seconde population microbiologique est ici confortée.

Tout au long du stockage et pour toutes les modalités d'arrachage, les concentrations en fructose sont inférieures à celles de glucose. L'allure des courbes est comparable à celle de l'essai conservation/variétés (voir la figure n°71).

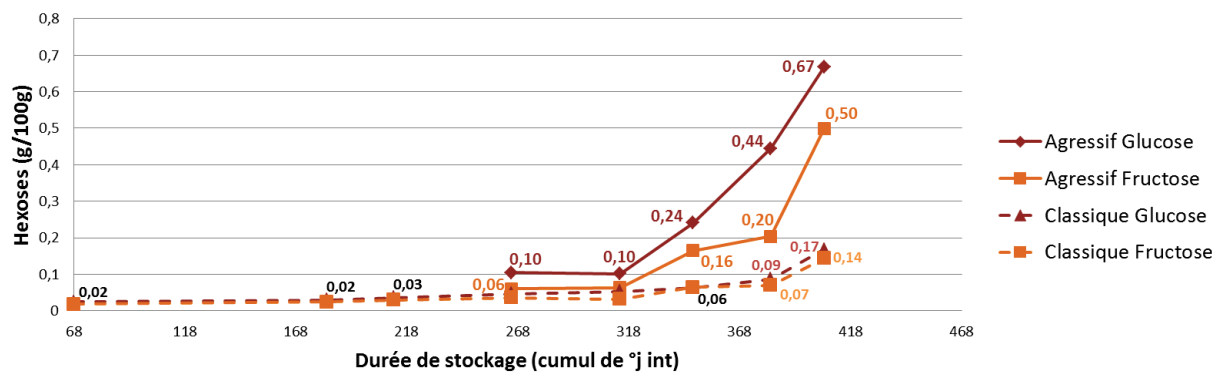


Figure n°71 : Évolution des concentrations de glucose et de fructose au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD Origny.

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Les facteurs arrachage et durée sont prédominants également dans cet essai, autant pour le glucose que pour le fructose (respectivement 32 % et 31 %) ; et l'interaction arrachage/durée est également significative (24 % en moyenne pour les deux hexoses).

Les différences entre les arrachages manuel et classique (et entre manuel et agressif) sont significatives dès la semaine 4 (toujours pas de différences significatives entre l'arrachage classique et la modalité chaulage).

Les différences entre les arrachages classique et agressif sont significatives dès la semaine 4 également.

Pour un arrachage classique, les différences entre les concentrations en hexoses au cours du stockage sont significatives entre la fin de stockage et tous les autres prélèvements.

Pour un arrachage agressif, les différences entre les concentrations en hexoses au cours du stockage sont significatives entre la fin de stockage et les autres prélèvements, excepté l'avant-dernier (382°j int).

Ces résultats signifient que la production d'hexoses augmente progressivement au cours du stockage, avec une production accentuée à environ 400°j int, engendrant une différence significative avec les précédentes concentrations. C'est la seconde phase de croissance exponentielle, observée précédemment avec les résultats de taux de pourriture.

De plus, la production d'hexoses est en lien avec les blessures de l'arrachage. En figure n°70, il est observé une production d'hexoses 3,8 fois plus importante en fin de stockage avec un arrachage agressif comparée à un arrachage classique.

Une forte corrélation est mesurée entre la production d'hexoses et les pertes en sucre (voir la figure n°72). Même si la production d'hexoses semble expliquer une partie de la consommation de saccharose, elle ne correspond pas à la totalité des pertes. Au regard de la figure n°72, il est observé des pertes en saccharose supérieures à la production d'hexoses.

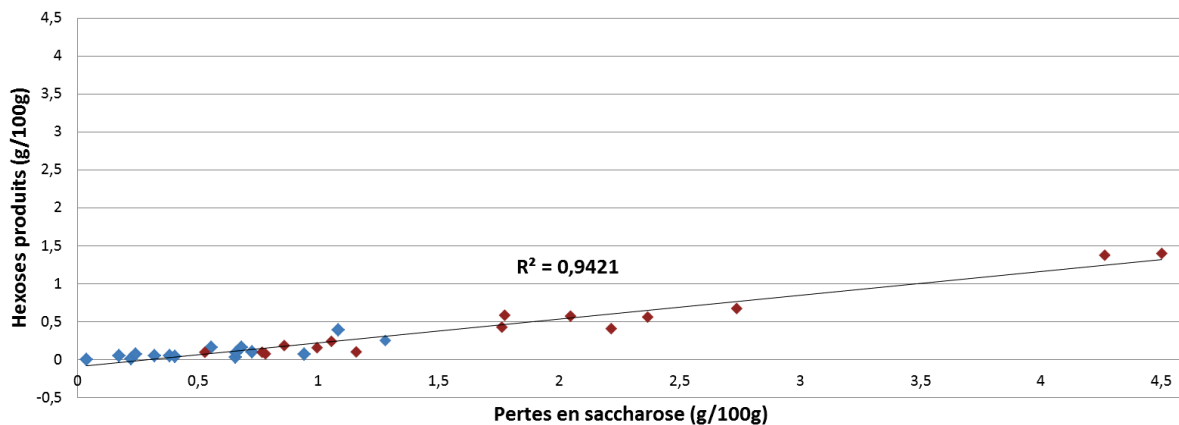


Figure n°72 : CLD d'Origny – Corrélation entre la production d'hexoses et les pertes en saccharose au cours du stockage en fonction de l'arrachage – Essai CLD d'Origny – De 212°j int à 406°j int.

Arrachage classique ↔ points bleus.

Arrachage agressif ↔ points rouges.

c. Matière sèche (MS)

i. Essai conservation/variétés

La mesure de MS permet d'évaluer la quantité de matière présente dans les racines. Elle comprend l'ensemble des éléments carbonés (solubles et insolubles) et les sels minéraux. Elle suit la même tendance que les pertes en sucre, et permet d'évaluer les éléments perdus (volatilisés) et les éléments transformés (présents dans la racine).

En silo (arrachage mécanique), les tendances variétales sont les mêmes sur les deux sites et comparables aux résultats de richesse.

Les concentrations en MS sont légèrement plus élevées sur le site de Lillers (de 2,5 % en moyenne par rapport à la valeur d'Origny). À rappeler que les richesses sont également plus élevées sur Lillers, ce qui explique en partie une concentration en MS plus élevée sur ce site. Un regroupement a été fait pour la représentation graphique (voir la figure n°73).

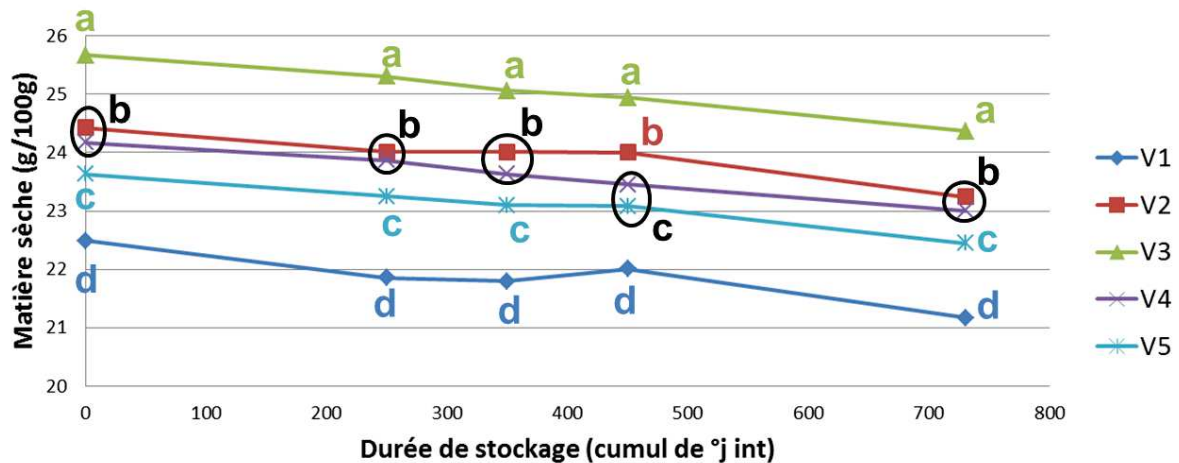


Figure n°73 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage par variété – Essai conservation/variétés - Année 1 – Deux sites – Arrachage mécanique.
 Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Le facteur variété est prédominant sur cette mesure (74 %). Les facteurs durée et lieu apparaissent nettement moins significatifs (respectivement 9 % et 6 %).

Les concentrations en MS seraient donc davantage dépendantes de la variété. Il a été observé des différences variétales pour la richesse et les concentrations en glucose, à J0 et au cours du stockage. Cette observation peut expliquer en partie les résultats de MS.

Pour les pertes de MS, il est observé trois fois plus de pertes en moyenne en fin de stockage (730°j int) comparé au début de stockage (250°j int).

8 % de pertes en plus sont engendrées avec un arrachage mécanique comparé à un arrachage manuel en fin de stockage (voir la figure n°74). Cette faible différence peut s'expliquer par le biais créé par les mesures de poids, comme expliqué dans la partie M&M.

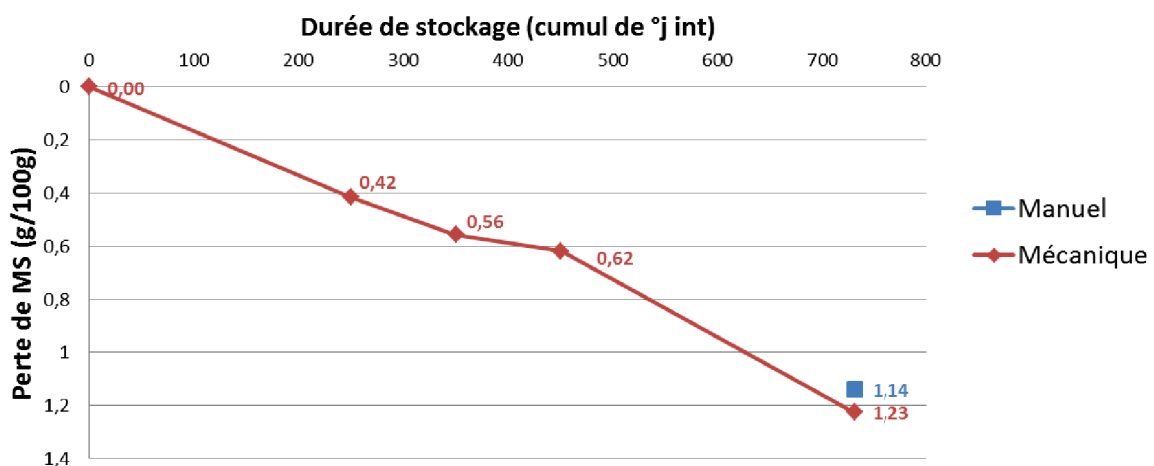


Figure n°74 : Pertes de matière sèche au cours du stockage – Essai conservation/variétés - Année 1 – Deux sites - Moyenne des pertes par variété.

Le facteur durée est prédominant sur la perte de MS (36 %) ; ensuite le facteur arrachage, évalué en fin de stockage (14 %). La résiduelle statistique peut être liée aux variations de poids, mesure sujette à des imprécisions, incluse dans le calcul de la perte de MS (cf. M&M).

En année 2, il est mesuré une concentration en MS plus faible sur le site d'Origny, comme observé pour la richesse (en moyenne, la concentration est plus faible de 1,5 % comparée à Lillers).

Les tendances des variétés sont les mêmes sur les deux sites (simplification de la figure n°75). Les trois variétés sont significativement différentes tout au long du stockage. En moyenne, V3 a 4 % de MS en plus comparée à V2 ; et 10 % de plus comparée à V1. D'après les caractéristiques variétales, V3 est la variété la plus riche, d'où une teneur en MS plus élevée que les deux autres variétés.

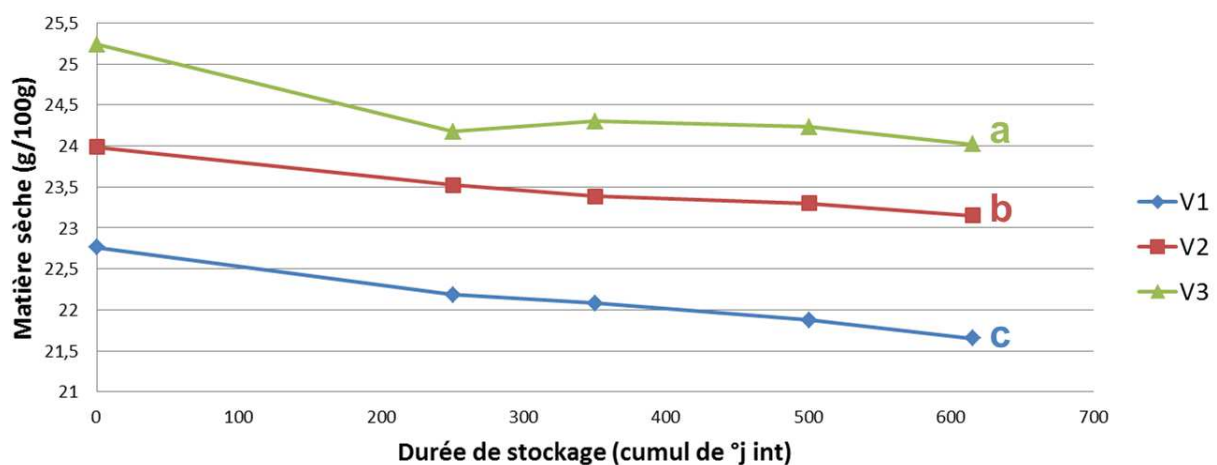


Figure n°75 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage en fonction de la variété – Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des deux sites et des deux types d'arrachage.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Le facteur variété est prédominant sur les concentrations en MS (49 %), comme en année 1. Le facteur lieu explique également la majeure partie de la variabilité de la mesure (31 %) ; et le facteur durée (7 %) est également significatif.

Pour les pertes de MS, une perte de 0,54 g/100g de MS est mesurée sur le site d'Origny ; et de 1,35 g/100g sur le site de Lillers (voir la figure n°76).

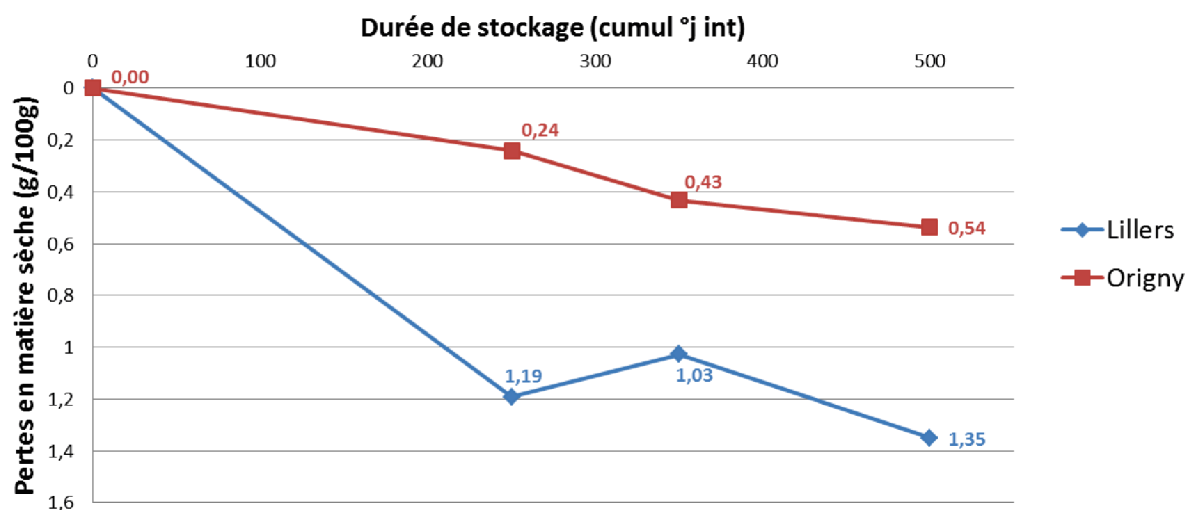


Figure n°76 : Pertes de matière sèche au cours du stockage en fonction du lieu – Essai conservation/variétés - Année 2.

Regroupement des variétés et des deux types d'arrachage.

Les facteurs durée et lieu sont prédominants (respectivement 26 % et 20 %), comme pour les pertes de saccharose. L'interaction durée/lieu est significative (6 %). La faible significativité du facteur arrachage (2 %) est probablement due aux biais des mesures de poids, impactant les résultats des pertes de MS. En raison de conditions météorologiques difficiles, de la terre est venue enrober les racines le jour de la récolte. En séchant pendant le stockage en silo, cette terre s'est décollée des racines et n'était plus comptabilisée dans les poids de sortie de stockage, créant alors un biais par rapport aux mesures initiales.

ii. Essai CLD d'Origny

Dans l'essai CLD d'Origny, les concentrations en MS ont été mesurées pour les arrachages classique et agressif.

La teneur initiale est de 23 %.

Une perte de 2 % est mesurée en fin de stockage pour un arrachage classique comparé au début de stockage (voir la figure n°77). Comme observé pour les pertes en sucre, l'arrachage agressif augmente les pertes de MS (8 % de pertes en plus comparé à l'arrachage classique en fin de stockage).

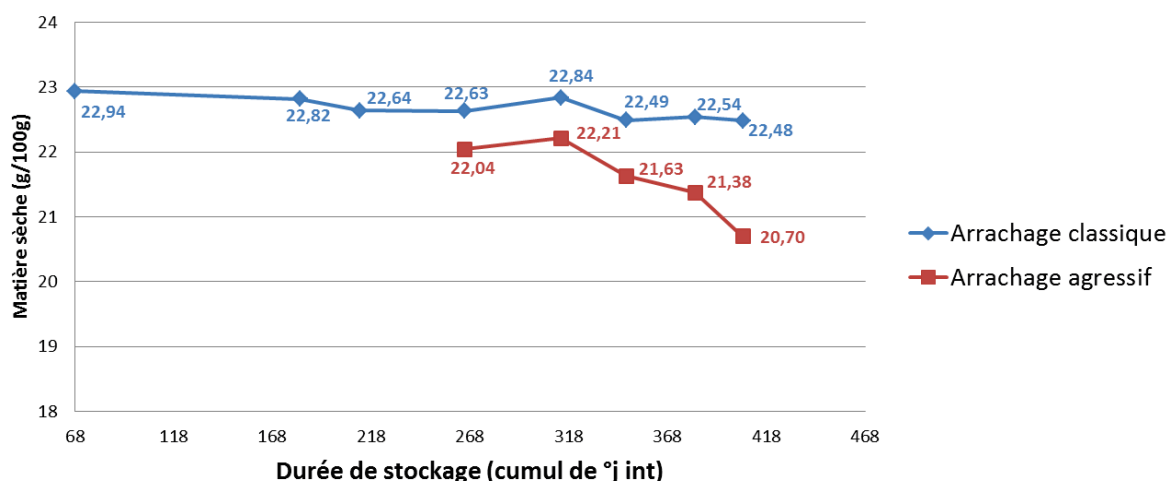


Figure n°77 : Évolution des concentrations en matière sèche au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.
Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

Les facteurs arrachage et durée sont responsables de la variabilité des mesures (respectivement à 81 % et 18 %).

Les différences entre l'arrachage classique et agressif sont significatives dès la semaine 4 (265j int).

Pour les pertes de MS, elles sont 2 fois plus élevées avec un arrachage agressif en fin de stockage (voir la figure n°78). À noter que pour un arrachage classique, une perte de MS comparable à celle enregistrée pour l'année 2 du projet conservation/variétés (site d'Origny) est mesurée.

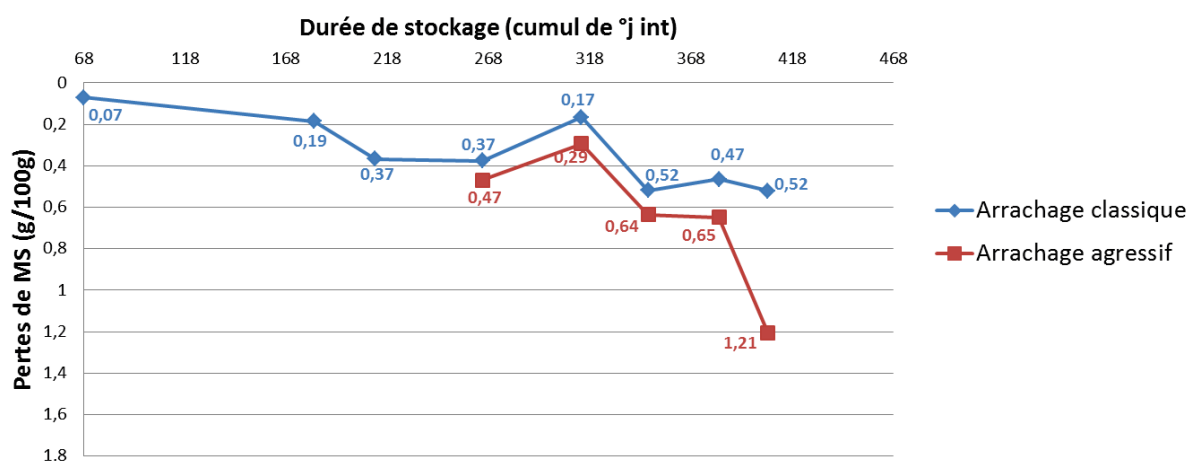


Figure n°78 : Pertes de MS au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

C'est le facteur durée qui est prédominant (71 %), comme pour l'essai conservation/variétés sur les deux années. L'interaction durée/arrachage est significative (20 %), et le facteur arrachage également (8 %).

Comme pour les pertes de saccharose, c'est à 314°j int qu'est observée la première phase de perte, pour les deux types d'arrachages. Elle est suivie d'une phase de décélération ; puis, à 382°j int, une seconde phase de perte exponentielle est mesurée, accentuée avec l'arrachage agressif (le parallèle avec la croissance microbologique est également présent ici).

Si l'on s'intéresse à la corrélation entre les pertes de MS et de saccharose, on s'aperçoit que la totalité du saccharose consommé n'est pas comptabilisée dans la perte de matière sèche (voir la figure n°79). Les pertes en saccharose sont plus élevées que les pertes de MS, ce qui appuie l'hypothèse de la dégradation du saccharose en d'autres molécules, non volatilisées (respiration et production de COV), mesurées dans les échantillons de râpures de racines (voir le chapitre 3 avec l'identification d'un composé, autre que les hexoses, indicateur de la dégradation des racines).

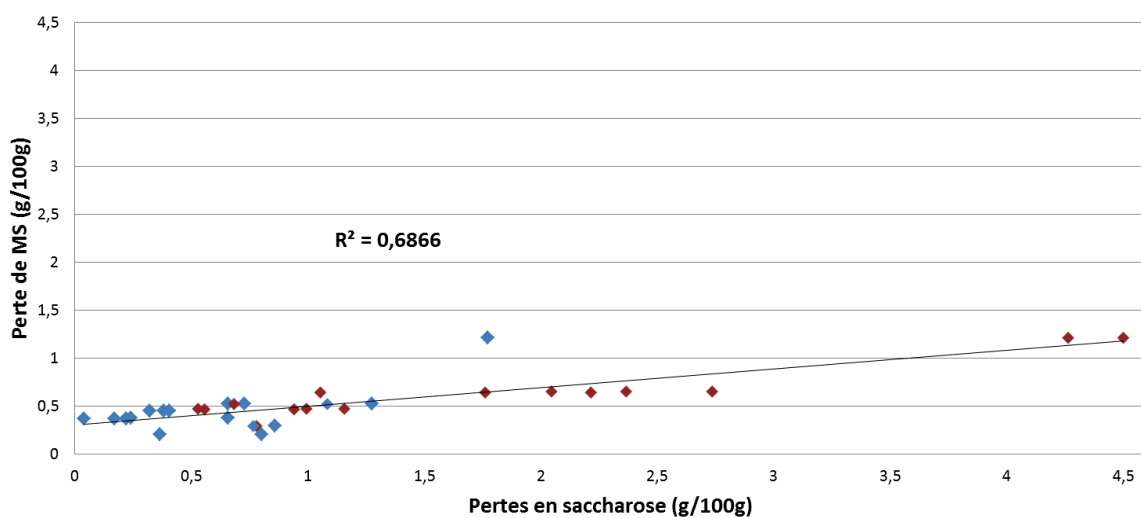


Figure n°79 : Corrélation entre les pertes de MS et de saccharose au cours du stockage -
Essai CLD d'Origny.
 Arrachage classique ↔ points bleus.
 Arrachage agressif ↔ points rouges.

d. Bétaïne

i. Essai conservation/variétés

Grâce à la méthode HPLC mise au point en 2016, les teneurs en bétaïne ont pu être mesurées pour l'année 2 de l'essai conservation/variétés.

Excepté à la récolte où les trois variétés sont significativement différentes, pendant le stockage V2 et V3 ont les teneurs en bétaïne les plus élevées et appartiennent à la même classe (voir figure n°80).

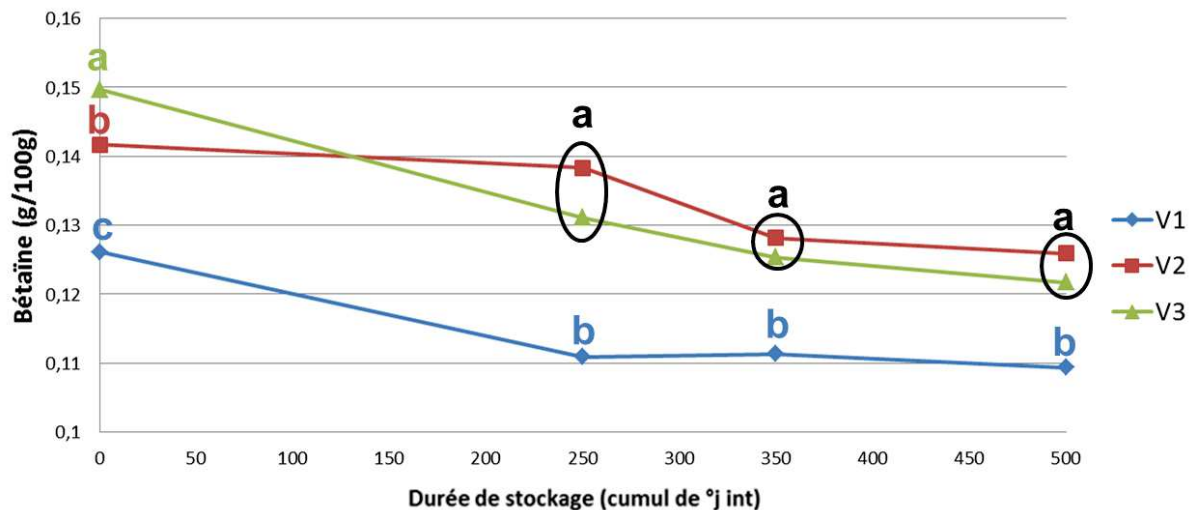


Figure n°80 : Évolution des teneurs en bétaine au cours du stockage par variété - Essai conservation/variétés - Année 2 – Deux types d'arrachages confondus.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

La bibliographie rapporte que les variétés les plus riches ont les teneurs en bétaine les plus élevées [Rearick et al., 1993 ; Trzebinski et al., 1985]. Dans cet essai, à la récolte (0°j), V3 a la teneur en bétaine la plus forte et possède également la concentration en saccharose la plus élevée (voir les caractéristiques variétales du tableau n°4 et les résultats de saccharose). Inversement pour V1 qui possède les concentrations en bétaine et saccharose les plus faibles. Néanmoins, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les concentrations en bétaine et celles en saccharose.

C'est une tendance à la diminution des teneurs en bétaine qui est observée au cours du stockage (en moyenne, moins 14 % en fin du stockage comparé aux concentrations initiales). Comme les tendances sont les mêmes pour les deux types d'arrachages et que les effets variété et durée sont prédominants sur l'arrachage, les deux séries de mesures ont été regroupées pour renforcer la représentation graphique (voir la figure n°80). En effet, les facteurs variété et durée expliquent la majeure partie de la variabilité de la mesure (respectivement 28 % et 22 %) ; ensuite intervient le facteur arrachage (9 %). La part d'inconnue restante peut s'expliquer par les faibles concentrations mesurées, à la limite de la sensibilité de l'HPLC, et être attribuée à des erreurs d'intégration.

En fin de stockage, les teneurs ont tendance à être plus faibles avec un arrachage manuel (en moyenne, 15 % de moins comparé à un arrachage mécanique).

La fonction d'osmoprotectant de la bétaine, relatée dans la bibliographie pourrait expliquer les concentrations plus élevées avec un arrachage mécanique [Beringer et al., 1986 ; Kenter and Hoffmann, 2009 ; Rearick et al, 1993 ; Yamada et al., 2015]. En effet, la stabilité qu'elle apporte aux membranes cellulaires ainsi que l'équilibre osmotique qu'elle crée pour conserver le saccharose à l'intérieur des vacuoles pourraient être une stratégie de défense des racines. En cas de blessures, la bétaine participerait au maintien de l'intégrité des cellules et de la conservation du saccharose à l'intérieur des vacuoles (équilibre osmotique), limitant ainsi les

fuites de sucres et luttant contre les contaminations microbiologiques. Ces hypothèses pourraient expliquer la tendance à une concentration de bétaine plus élevée dans les cellules avec un arrachage mécanique. Son rôle dans les réactions de défense des plantes, la résistance aux stress abiotiques principalement, est mis en valeur dans plusieurs articles [Hanson and Wyse, 1982 ; McNeil et al., 1999 ; Rontein et al., 2002].

ii. Essai CLD d'Origny

Dans cet essai, les facteurs durée et arrachage n'apparaissent pas significatifs (les limites de la méthode d'analyse mentionnées précédemment sont également à prendre en compte ici, notamment pour expliquer l'allure des courbes). Les variations des teneurs en bétaine au cours du stockage, ainsi que les différences entre les modalités d'arrachage ne seraient pas significatives.

Cependant, les mêmes tendances que celles de l'essai conservation/varieties sont observées. Les concentrations en bétaine ont tendance à diminuer au cours du stockage (analyses HPLC de la semaine 1 à 8).

Pour les arrachages classique et manuel, de faibles pertes sont mesurées (environ 5 % de J0 à la fin de stockage). Pour l'arrachage agressif, aucune diminution n'est mesurée (voir la figure n°81).

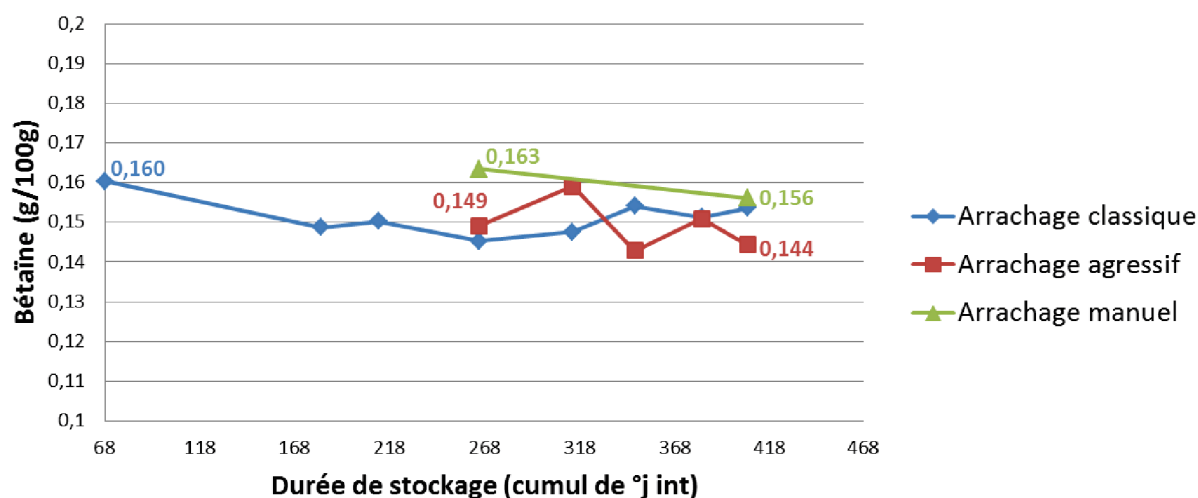


Figure n°81 : Évolution de la concentration en bétaine au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.

Un point représente la moyenne des mesures sur 3 sacs.

e. Raffinose

Ce trisaccharide serait synthétisé par les racines pour lutter contre le gel (cf. l'état de l'art du chapitre 1).

Les teneurs en raffinose ont été trop faibles dans le cadre de ces essais pour pouvoir les quantifier avec suffisamment de précision (< 0,01 g/100g de matière fraîche).

Pour de futurs essais, il serait intéressant de faire cette analyse sur des racines gelées (avec le climat de ces deux années et des sacs situés au cœur des silos, aucune racine gelée n'a été analysée).

❖ Conclusion sur les changements biochimiques au cours du stockage

Par ce travail de recherche, plusieurs modifications biochimiques au sein des racines au cours du stockage ont pu être identifiées.

Globalement, le facteur durée apparaît prédominant sur l'ensemble des mesures. Dans le cadre de ces essais, la durée du stockage est liée à la température puisqu'il s'agit d'un cumul de températures à l'intérieur des silos. De ce fait, les changements au sein des racines, principalement les pertes en saccharose, seront d'autant plus conséquents que la température cumulée au sein des silos sera élevée.

Les variations de ces cumuls de température sont également à prendre en compte. En effet, en année 1 de l'essai conservation/variétés, les 730°j int ont été atteints mi-décembre 2015 ; alors que les 615°j int de l'année 2 ont été cumulés fin janvier 2017. Et malgré les ajustements de la méthode d'évaluation du développement de pourriture, il est observé que les IP de l'année 1 sont supérieurs à ceux de l'année 2. Le développement de pourriture est favorisé par des ambiances chaudes et humides ; des cumuls de températures trop rapides favorisent les contaminations microbiologiques.

Le climat de l'année déterminera donc la durée de stockage des silos.

Au cours du stockage, le facteur arrachage gagne en significativité. L'essai CLD d'Origny illustre ce constat, avec une production d'hexoses et des pertes en sucre et MS accentuées à partir de 314°j int. Plus les racines sont blessées, plus des changements biochimiques se mettent en place au cours du stockage. Ils finissent par être conséquents et néfastes au procédé industriel.

Le lieu et la variété sont également responsables d'une partie de la variabilité de la composition biochimique des racines. En effet, à J0, le jour de la récolte, les effets de ces facteurs sont prédominants.

En année 2 de l'essai conservation/variétés, à J0, le lieu est par exemple responsable de 61 % de la variabilité des résultats de richesse, la variété de 34 %, et l'interaction de ces deux facteurs compte pour 3 %.

Pour les concentrations initiales en glucose, la variété et le lieu sont les facteurs responsables de la majorité de la variabilité des résultats (respectivement 38 % et 26 % ; 19 % pour l'interaction de ces deux facteurs). Ces résultats sont confirmés en année 1 également. Ils illustrent l'importance de la nature, de la composition et de l'état sanitaire du sol pour la qualité des racines, et également l'intérêt d'un choix judicieux dans la sélection variétale. Même s'ils ne représentent pas les facteurs prédominants au cours du stockage de longue durée, ils contribuent à la qualité initiale des racines avant le stockage, et cette information n'est pas négligeable lorsqu'une stratégie de longues campagnes est lancée.

Les pertes en sucre sont principalement impactées par la durée du stockage, dépendante du climat. Comme vu dans les essais, entre le début (250°j int) et la fin du stockage (plus de 400°j int), les pertes en sucre sont multipliées par 4 en arrachage classique.

En fin de stockage, le facteur arrachage est prédominant.

Il a été vu que les racines consomment naturellement leur saccharose pour maintenir leur métabolisme au cours du stockage. Il s'agit principalement de la respiration.

Pour des racines intactes (arrachage manuel), cette consommation représenterait environ 0,45 g de saccharose pour 100 g de matière fraîche (voir la figure n°64).

Avec des blessures infligées par un arrachage classique, les pertes de saccharose seraient multipliées par 2 environ comparées à un arrachage manuel. Celles-ci s'expliquent par l'utilisation d'énergie par la racine pour cicatriser ces blessures, et également par la consommation de sucres par les pathogènes (taux de pourriture d'environ 3 %).

Avec un arrachage agressif occasionnant davantage de blessures aux racines, les pertes de saccharose sont quasiment multipliées par 7 comparées aux pertes d'un arrachage manuel ; et multipliées par 3,5 comparées à celles d'un arrachage classique (voir la figure n°64). Les racines doivent fournir davantage d'énergie pour cicatriser et lutter contre les contaminations microbiologiques (taux de pourriture multiplié par 4,5) ; de ce fait, leur respiration augmente [Akeson and Stout, 1978 ; Wyse and Peterson, 1978]. De plus, le saccharose est consommé par les pathogènes pour leur propre développement.

Les pertes en sucre sont donc directement corrélées au développement de pourriture (voir la figure n°65).

Dans le cadre de l'essai conservation/variétés, les facteurs variété (en année 1) et lieu (en année 2) expliquent également une partie de la variabilité des pertes en saccharose en fin de stockage.

En année 2, le facteur lieu illustre davantage l'impact des conditions de récolte propres à chacun des sites (conditions pluvieuses pour le site de Lillers notamment) que les caractéristiques du sol. Néanmoins, la contribution des différents types de sol au stockage de longue durée n'est pas à écarter et demanderait des analyses complémentaires.

Pour ce qui est du facteur variété, la résistance au développement de pourriture est la caractéristique clef de la conservation longue durée. En se référant aux résultats d'IP, il est observé des différences variétales accentuées avec la durée de stockage. Les trois variétés étudiées en année 2 ont des caractéristiques de résistance à la pourriture différentes, et se retrouvent dans trois classes différentes en fin de stockage. Malgré des différences de pertes en sucre non significatives dans le cadre de cet essai, le facteur variété est à considérer dans la perspective de stockage de longue durée, notamment en cas de récoltes difficiles (conditions pluvieuses et réglages machine agressifs).

La variété V1 avec sa faible résistance à la pourriture enregistre 0,6 g pour 100 g de matière fraîche de pertes en plus que V2 en fin de stockage avec un arrachage classique (en année 1, voir la figure n°59). Il a été vu qu'un arrachage agressif multiplie par 3,5 les pertes en saccharose comparées à celles d'un arrachage classique, chez une variété de résistance intermédiaire à la pourriture (utilisée dans le cadre de l'essai CLD d'Origny). Cela signifie que l'utilisation d'une variété de faible résistance au développement à la pourriture, stockée

pour un cumul de plus de 700°j (atteint à la mi-décembre en 2015) occasionnerait une perte supplémentaire de 2,1 g de saccharose pour 100 g de matière fraîche comparée à une variété résistante à la pourriture, en cas d'arrachage agressif.

Avec la logistique mise en place au sein de Tereos et la qualité de conseil auprès des agriculteurs, ces conditions non optimales devraient être évitées. Cependant, la météo ne se commande pas et les chauffeurs des machines de récolte ont des délais à respecter. Pour ces raisons, il est nécessaire de ne pas négliger le facteur variété dans la perspective des longues campagnes.

Grâce à la méthode HPLC mise au point en 2016, les pertes en sucre ont donc pu être identifiées de façon plus précise qu'au préalable. Les changements biochimiques au cours du stockage ont pu être en majeure partie mesurés grâce à cette méthode. Elle est nouvelle dans le suivi des changements au cours du stockage des racines, et représente une amélioration du suivi des concentrations en saccharose et en glucose notamment.

Les pertes de matière mesurées relèvent de la volatilisation des éléments puisqu'ils ne se retrouvent plus dans la racine (respiration et production de COV).

Les pertes de saccharose sont comprises dans les pertes de MS. Au regard de la figure n°79, il est observé que les pertes en saccharose sont supérieures aux pertes de MS.

Une partie du saccharose perdu n'est pas volatilisée et est alors toujours présente dans les racines. Il s'agit des éléments transformés. Le saccharose perdu est transformé en d'autres molécules comprises dans la MS restante.

Au-delà de 350°j int. (ou 314°j int dans l'essai CLD d'Origny), les pertes en saccharose augmentent de façon plus importante que les pertes de MS. À partir de ce cumul de température, il y a donc une production accentuée de matière à partir du saccharose, comparée au début de stockage. Cette durée correspond notamment à la durée limite de stockage recommandée par Tereos (250°j ext), de façon à prévenir des pertes de saccharose trop conséquentes.

En faisant le lien avec les résultats d'IP et de taux de pourriture de ces essais, il est observé une croissance exponentielle du développement de pourriture à partir de cette durée. En présence de maladies, la transformation du saccharose en d'autres métabolites (hexoses notamment) est accentuée, engendrant en moyenne deux fois plus de pertes qu'en début de stockage avec un arrachage classique.

Grâce aux analyses HPLC, la majeure partie des composés issus de la transformation du saccharose a pu être identifiée.

En arrachage manuel, environ 87 % des pertes sont identifiées en tant que perte de MS, la production d'hexoses est quasiment nulle (voir la figure n°82).

En arrachage classique (essai conservation/variétés et CLD), en moyenne, 77 % des pertes sont identifiées avec 59 % de pertes de MS et 18 % de production d'hexoses (voir les figures n°83 et n°84).

Pour un arrachage agressif, 63 % des pertes sont identifiées : 33 % de pertes de MS et 30 % de production d'hexoses (voir la figure n°85). Comme observé précédemment (voir la figure n°59), la production d'hexoses en fin de stockage avec un arrachage agressif est multipliée par 4 comparée à un arrachage classique (essai CLD).

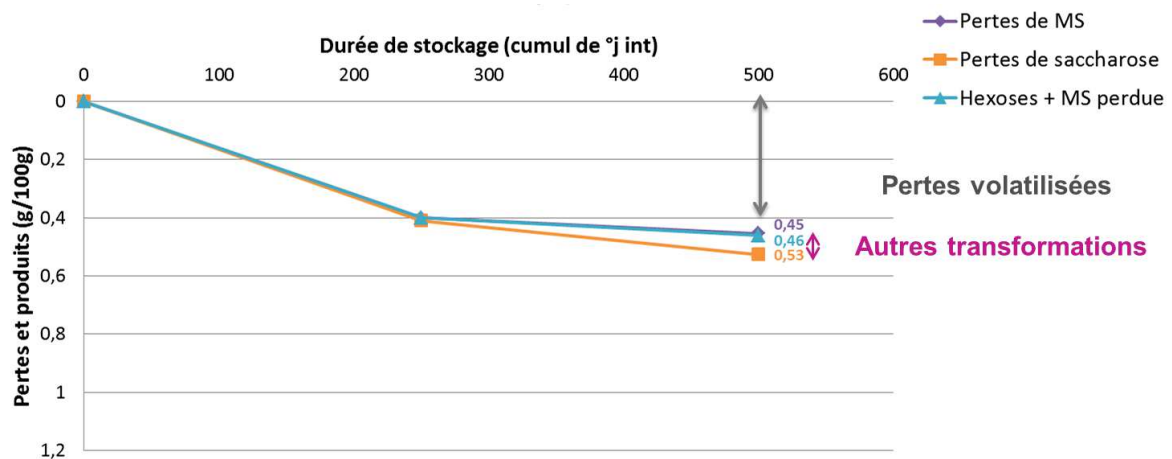


Figure n°82 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage – Essai conservation/variétés - Année 2 – Arrachage manuel – Site d’Origny.

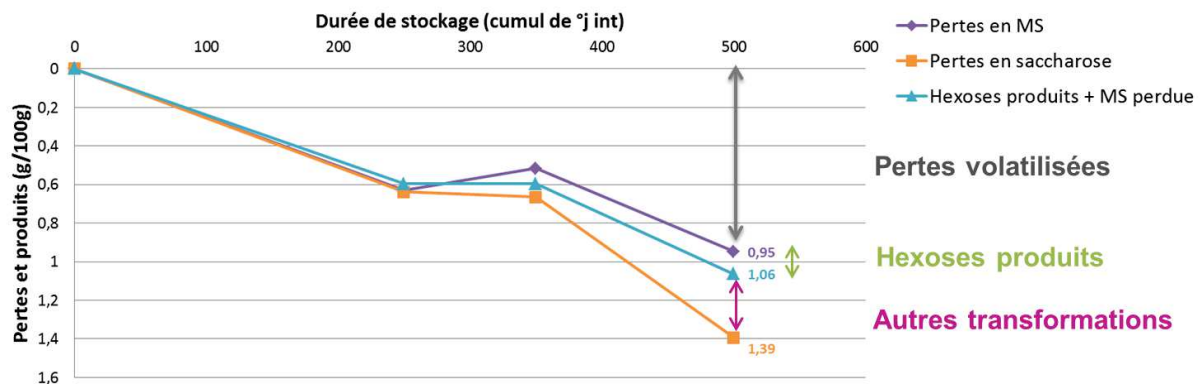


Figure n°83 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai conservation/variétés - Année 2 - Arrachage mécanique classique – 2 sites.

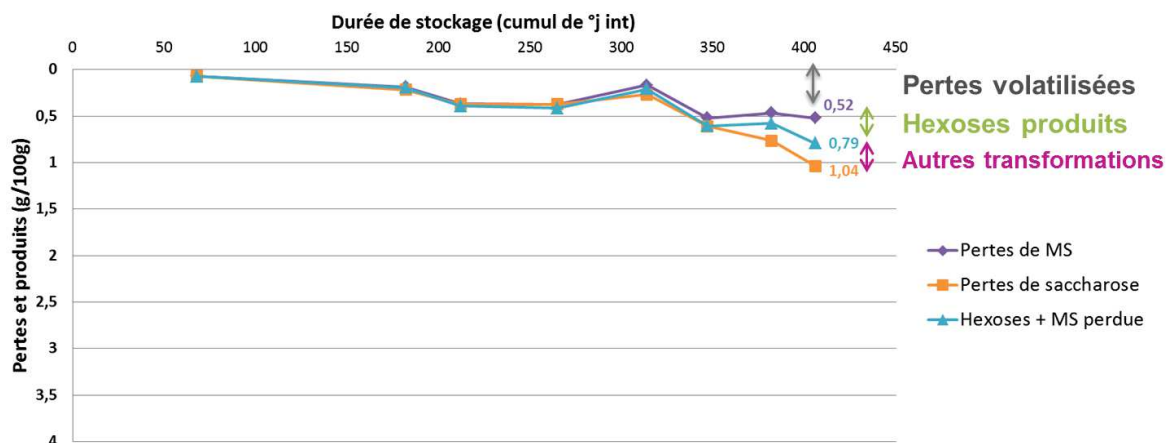


Figure n°84 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d’Origny – Arrachage classique.

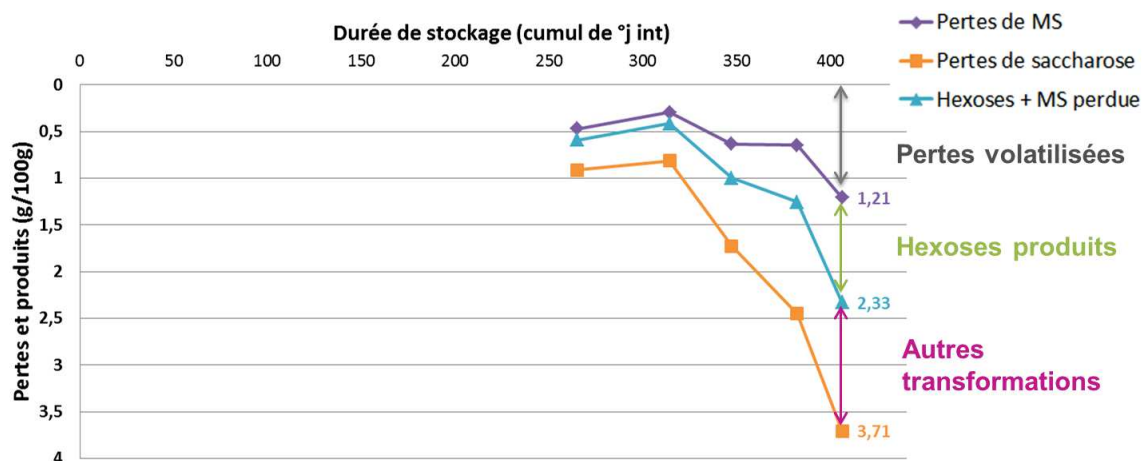


Figure n°85 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.

Il a été observé un taux de pourriture plus élevé chez les racines fortement blessées. En allant plus loin dans l'analyse du chromatogramme obtenu par HPLC, un composé, indicateur de contaminations, explique le reste des pertes en sucre de l'arrachage agressif (voir le chapitre 3).

3) Bilan des changements physiques et biochimiques au cours du stockage et perspectives

Des modifications physiques et biochimiques des racines pendant le stockage ont pu être identifiées.

Il a été observé que ces changements sont dépendants du cumul des températures, de l'arrachage, de la variété, ou encore du lieu ; et qu'ils expliquent une part importante des pertes en saccharose.

Dans un premier temps, suite à l'arrachage, les racines doivent cicatriser de leurs blessures pour limiter les fuites de saccharose des cellules endommagées, et combattre les contaminations microbiologiques.

Une augmentation de la fraction insoluble des racines est observée au cours du stockage (marc). Cette fraction insoluble se compose de fibres et de pectines. Les fibres apportent imperméabilité et résistance aux cellules ; alors que les pectines confèrent cohésion et organisation. Il a été observé qu'entre le jour de la récolte et la fin du stockage, les teneurs en fibres totales augmentent ; alors que celles en pectines diminuent. Les racines favoriseraient alors les propriétés de rigidité et d'imperméabilité pariétale au cours du stockage.

Cette observation est compatible avec les hypothèses de cicatrisation et de défense contre les pathogènes. Un coefficient de corrélation de 0,6 est mesuré entre la perte de saccharose et le gain en marc de l'année 2 de l'essai conservation/varieties (voir l'annexe n°19 ; corrélation non-significative entre le gain en fibres et la perte en saccharose). La synthèse de fraction insoluble représenterait une partie de la consommation de saccharose au cours du stockage.

Des différences variétales significatives sont évaluées pour les mesures de marc et de résistance physique. Ces deux mesures sont fortement corrélées ($R^2 = 0,85$), et fortement dépendantes du génotype. Ce sont d'ailleurs les deux seules mesures (fibres et pectines incluses dans le marc) pour lesquelles le facteur variété est globalement prédominant dans cette étude. Les caractéristiques physiques des racines seraient donc davantage d'origine génétique que liées à l'environnement. Et plus précisément, davantage liées à la capacité d'une variété à produire une MEC compacte, propriété attribuée au gel formé par les pectines (forte corrélation entre la résistance physique et la concentration en pectines à J0, voir la figure n°54).

La corrélation entre le marc et le développement de pourriture est sous-entendu ; mais elle est plus forte en considérant la concentration en pectines à J0 et les IP de fin de stockage.

Avec des concentrations en pectines initiales élevées (et une forte résistance physique), V2 a l'IP le plus faible en fin de stockage ; contrairement à V1, qui, avec ses faibles concentrations en pectines (et sa faible résistance physique) a l'IP le plus élevé.

Pour V3, la corrélation est moins nette. Avec une résistance physique proche de V2, un IP intermédiaire est mesuré en fin de stockage (environ le double de l'IP de V2). En observant les résultats de pectines à J0 de V3 (année 2), la concentration est significativement plus faible que celle de V2 (voir la figure n°52). Une faible concentration en pectines est mesurée sur le site d'Origny en année 2 pour V3, corrélée à un IP élevé (voir la figure n°55). La capacité d'une variété à former un gel de pectines dense, assurant la cohésion des fibres et la dureté des structures cellulaires, pourrait être une explication des différences variétales de mesures de résistance physique.

L'arrachage reste le facteur prédominant sur le développement de pourriture ; l'effet variété n'apparaît significatif qu'à partir d'un cumul de 350°j int.

Dans un second temps, les racines doivent adapter leur métabolisme au stockage en silo. Comme vu précédemment, en fonction de la variété, une production de fibres plus ou moins significative expliquerait une partie des changements au cours du stockage. Néanmoins, les consommations de saccharose s'expliquent principalement par des modifications biochimiques au cœur des racines, dépendantes principalement de la durée de stockage (en lien avec la température), et de l'arrachage.

Pour un arrachage manuel, la majorité des pertes s'explique par de la perte de matière sèche (87 %). Comme mentionné au chapitre 1 dans l'état de l'art, la respiration représente plus de 70 % des pertes en saccharose au cours du stockage ; c'est ce qui est observé dans ces essais. Environ 0,5 g de saccharose pour 100 g de matière fraîche seraient consommés par le métabolisme propre des racines, pour un stockage d'environ 2 mois. Ce résultat équivaut à la perte de 5 kg de saccharose / T de racines en fin de stockage (soit environ 83 g/T/jour de stockage).

Pour un arrachage classique, les pertes sont identifiées à 76 %. 68 % d'entre elles sont attribuées à de la perte de MS, et 8 % à de la production d'hexoses. Les machines de récolte blessent les racines. En plus de leur métabolisme de base, les racines doivent combler les blessures, par la synthèse de fibres notamment, et se défendre contre les contaminations. Leur respiration est alors augmentée, et le catabolisme du saccharose également. Les pertes en saccharose sont alors en moyenne doublées comparées à celles d'un arrachage manuel (la

moyenne des 2 essais conduit à une perte de 1,2 g/100g de matière fraîche, soit 200 g/T/jour, comme annoncé dans la bibliographie).

Pour un arrachage agressif, seulement 52 % des pertes sont identifiées par les pertes de MS et la production d'hexoses (respectivement 33 % et 19 %). D'autres transformations du saccharose, non identifiées en arrachage classique, ont lieu ici. Avec des blessures plus profondes, les racines consomment davantage d'énergie ; mais les contaminations microbiologiques sont plus importantes. Comme évalué dans l'essai CLD d'Origny, le développement de pourriture est facilité (4,5 fois plus de pourriture qu'avec un arrachage classique). Il serait à l'origine de pertes en saccharose environ 3 fois plus importantes qu'un arrachage classique en fin de stockage ; avec notamment, la synthèse de sucres adaptés aux métabolismes des pathogènes (voir le chapitre 3).

3,71 g/100g de pertes en saccharose sont mesurés en fin de stockage de l'essai CLD d'Origny avec un arrachage agressif (75 jours de stockage) ; soit environ 495 g/T/j de pertes en saccharose chez des racines fortement blessées.

C'est donc principalement par la respiration, voire la synthèse de composés organiques volatils (COV), par la production d'hexoses et d'autres sucres que s'expliquent les pertes de saccharose au cours du stockage.

Des analyses métaboliques permettraient d'étudier les métabolites produits par les racines pour se défendre contre les pathogènes, et peut-être expliquer le reste des pertes en sucre des arrachages classique et agressif.

Avec l'HPLC, l'évolution des concentrations en bétanine au cours du stockage et en fonction de l'arrachage a également été suivie. Ces concentrations semblent principalement impactées par le facteur variété, voire la durée et l'arrachage (mais non significatifs dans l'essai CLD d'Origny). La bétanine est synthétisée dans les feuilles et est transportée jusqu'aux cellules des racines où elle occupe un rôle d'osmolyte principalement (voir le chapitre 1. 1.c.ii). Elle assure l'équilibre osmotique entre les différents milieux (entretien des gradients de pression de l'eau, nécessaires au fonctionnement du métabolisme de la plante). En d'autres termes, plus la vacuole d'une cellule de stockage de la racine est concentrée en saccharose, plus le milieu cytoplasmique de la cellule est chargé en bétanine. Et c'est ce qui a été observé à travers le projet conservation/varieties. La variété la plus riche (V3) a une concentration en bétanine plus élevée et significativement différente de la variété la moins riche (V1).

Les racines mettent en place des mécanismes et stratégies de défense afin de limiter leur perte en sucre. Le maintien des teneurs en bétanine dans les cellules pourrait faire partie de l'une de ces stratégies.

L'émission de « molécules signal » pourrait en être une autre, afin d'activer la résistance systémique de la racine. Et lorsqu'il est trop tard, des produits de dégradation émanent des racines sous forme de composés organiques volatils (COV).

L'identification de ces molécules serait stratégique pour l'industrie sucrière, qui pourrait alors mettre en place les moyens nécessaires afin d'évacuer rapidement les racines en danger et en cours de dégradation.

L'étude de l'impact de ces changements sur le procédé sucrier a fait l'objet d'une seconde thèse. En effet, en parallèle de l'identification et de l'explication des changements physiques

et biochimiques des racines, il est essentiel de connaître les conséquences d'un stockage de longue durée sur le procédé industriel. Pour ce faire, différents paramètres ont été suivis, indicateurs de la qualité industrielle des jus extraits des racines (voir la partie « Discussion générale et lien avec le procédé sucrier »).

Cependant, il serait intéressant de détecter les problèmes en amont, et non pas au moment de l'entrée des racines dans les usines. L'identification d'outils qui seraient capables de déceler des racines en cours de dégradation en silo éviterait des problèmes de process, limiterait les pertes en saccharose, et représenterait des gains économiques conséquents pour l'industrie. Une partie du travail de thèse a été concentrée sur l'identification de tels outils ; les résultats sont rapportés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Indicateurs de contaminations des racines

Il a été vu dans le chapitre précédent que des changements biochimiques se produisaient au sein des racines, pendant leur stockage en silo. Ces changements semblent accentués en présence de contaminations microbiologiques.

Dans ce chapitre, on s'intéresse aux composés spécifiques de maladies, de façon à intervenir en amont d'une dégradation trop importante des racines. Des indicateurs de contamination permettraient d'évacuer plus rapidement les silos en cours de dégradation, et ainsi limiter les pertes en saccharose.

Avec les mesures réalisées dans le cadre des essais conservation/varieties et CLD d'Origny, décrits dans le M&M du chapitre 2, les hexoses apparaissent comme de potentiels indicateurs de contaminations. Le glucose est déjà mesuré aux laboratoires Tereos, par la méthode colorimétrique de TRINDER (voir l'annexe n°11). L'idée ici est de valider sa corrélation avec la présence de contaminations, et d'évaluer si le fructose possède la même caractéristique.

En focalisant sur la modalité « arrachage agressif » de l'essai CLD d'Origny, étudié dans le chapitre précédent, il est observé des pertes en sucre plus importantes qu'avec un arrachage classique. Celles-ci ne s'identifient pas à de la perte de matière ou à de la production d'hexoses, mais à la production d'un autre sucre, identifié grâce à l'HPLC. Il s'agirait d'un trisaccharide. Son identification permettrait de poursuivre l'identification des pertes en sucre au cours du stockage de racines fortement blessées.

Et pour approfondir la recherche et répondre aux besoins d'innovation de Tereos, un projet nouveau a été initié. Il s'agit de l'analyse des composés organiques volatils (COV).

En effet, les plantes synthétisent naturellement des COV via leurs racines, mais aussi leurs feuilles, leurs fleurs et leurs fruits, pour communiquer avec leurs congénères et leur environnement [Dudareva et al., 2006]. Ces COV agissent comme des molécules de signalisation et régulatrices des espèces réactives de l'oxygène [Spinelli et al., 2011]. Au cours de leur développement, les racines interagissent avec le sol et les micro-organismes via la production de COV (exsudats racinaires) pour modifier la composition chimique de leur environnement, ou encore la population biotique [Delory et al., 2016]. Comme elles ne peuvent pas se déplacer, elles modulent leur environnement via des signaux, de façon à l'adapter à leurs besoins.

L'identification des composés volatilisés produits lors du stockage permettrait de comprendre quelles réactions du métabolisme des racines sont impliquées, et de poursuivre l'explication des pertes en sucre.

De plus, par la recherche de COV spécifiques à la dégradation, cette analyse permettrait de développer un outil pour la détection rapide de silos en cours de dégradation. En pommes de terre, par exemple, le Lonestar de la société Owlstone, est utilisé pour la détection de tubercules malades, stockés en silo. Il s'agit d'une unité mobile, facile d'utilisation, capable de détecter un large spectre de COV par spectrométrie. D'autres outils, tel que Tiger de chez

Ion Science Ltd, ou Polaris de chez Pollution SRL, permettent la détection de COV de façon pratique.

Dans le cadre de la thèse, les objectifs sont d'initier les analyses de COV sur racines de betteraves et proposer des composés susceptibles d'être indicateurs de dégradation. Pour les deux années d'analyse, deux études ont été menées.

La première consistait à suivre l'évolution des COV au cours du temps et d'identifier des composés spécifiques à la fin de stockage. La seconde étude consistait à identifier les COV spécifiques des racines malades. Une maladie qui se propage rapidement en silo a été sélectionnée, celle de la racine violette, provoquée par une infection du rhizoctone violet (*Rhizoctonia crocorum/violacea*).

La recherche bibliographique a permis de confirmer qu'aucun résultat de ce type d'analyse sur racines de betteraves n'est disponible. Un article relate l'analyse COV sur du sucre de betterave, où la géosmine et d'autres composés acides seraient responsables de l'odeur désagréable apparaissant suite à une contamination pendant le stockage du sucre, ou en raison d'une matière première dégradée [Marsili et al., 1994 ; Moore et al., 2004].

Ce projet mené sur 2 ans a été réalisé en partenariat avec un laboratoire extérieur. Grâce à l'expérience du personnel du laboratoire dans l'analyse des arômes de fruits (fraise, notamment) avec la technique HS-SPME GC-MS, l'année 1 a consisté à optimiser la méthode et à tester les premiers échantillons. Les objectifs de l'année 2 étaient de consolider les premiers résultats.

1) Matériels et Méthodes

a. Essai CLD d'Origny et analyses HPLC

L'essai CLD d'Origny et la méthode d'analyse HPLC sont décrits dans le M&M du chapitre 2.

b. Analyse des composés organiques volatils (COV)

i. Échantillonnage

Pour le suivi de la production de COV au cours du stockage, les prélèvements ont été faits sur le silo conservation/varieties d'Origny. Quatre durées de stockage ont été analysées : de J0 à environ 500j intérieurs. En année 1, la variété la plus sensible à la pourriture a été étudiée (V1). En année 2, la variété résistante à la pourriture a été ajoutée (V2).

Pour l'identification de COV spécifiques des racines malades, des racines saines et atteintes des symptômes de la racine violette ont été prélevées d'un même silo (même variété) à proximité de l'usine d'Origny (voir la figure n°86).



Figure n°86 : Photos des racines saines (à gauche) et malades (à droite) utilisées pour l'analyse des COV – Sortie de la laveuse de l'atelier agronomique.

Les racines sont transformées en râpures dans l'atelier agronomique, suivant le protocole précédemment évoqué (cf. M&M du chapitre 2 de l'essai CLD d'Origny). Après l'obtention d'une râpuration homogène, le prélèvement doit s'effectuer rapidement afin d'éviter l'oxydation de l'échantillon et les contaminations. Pour assurer la stabilité de l'échantillon, une solution de chlorure de calcium à 1 g/mL, au ratio 1 : 2 a été ajoutée à l'échantillon (pour 1 gr de râpuration : 2 gr de solution à 1 g/mL). Cette solution agit comme un inhibiteur des réactions métaboliques. L'échantillon est ensuite plongé dans de l'azote liquide puis stocké à -80°C. Des tubes Fison de 15 mL ont été utilisés. Pour une répétition biologique, environ 8 répétitions techniques ont été prévues en année 2 (les trois répétitions biologiques ont été mélangées en année 1 : phase exploratoire).

Au laboratoire partenaire, l'échantillon est préparé pour l'analyse COV. Il est décongelé pendant 15 min à 35°C au bain marie. Environ 10 g sont prélevés et placés dans un tube adapté au passeur automatique d'échantillons de la GC-MS. Avant de refermer le tube, le contenu de celui-ci est soufflé pendant quelques secondes avec du diazote, afin d'éliminer les éventuelles contaminations.

ii. Analyses GC-MS

C'est la méthode HS SPME GC-MS qui a été utilisée [Nicolai et al., 2014 ; Vandendriessche et al., 2012 ; Vas and Vékey, 2004].

Suite à l'optimisation de l'année 1 (décrite plus loin), le programme GC-MS a été ajusté aux échantillons de râpuration de racines.

Positionné dans le passeur automatique, l'échantillon est incubé à 40°C pendant 45 min. Pendant l'incubation, l'espace volatile se forme au-dessus de la râpuration.

Suite à l'incubation, la fibre en siloxane (50/30 um DVB/CAR/PDMS, Stableflex, 24 Ga, Autosampler, 3 pk (Gray) de Supelco) vient s'insérer dans le tube et adsorber les composés volatils qui s'échappent de la râpuration. Cette phase d'extraction dure 1 heure.

La fibre va ensuite automatiquement se dégager de l'échantillon pour venir s'insérer dans la GC (7890 A de chez Agilent Technologies) pour une étape de désorption (10 min à 250°C). Le gaz utilisé est l'hélium.

Les molécules, entraînées par l'hélium, passent à travers la colonne de la GC (Agilent 19091J-433 HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane, 30 m de long*0,250 mm de diamètre*0,25 µm d'épaisseur). Un injecteur sans diviseur est utilisé afin de conserver la totalité de l'échantillon pour l'analyse (mode Splitless). Les composés sont séparés en fonction de leur poids, les petites molécules se détachent les premières de la colonne.

Les différents composés sont fragmentés par ionisation électronique. Les ions formés sont ensuite détectés et identifiés par le spectromètre de masse (5975 C VL MSD avec un détecteur trois axes de chez Agilent Technologies) en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Cette phase dure 45 min, avec l'obtention d'un chromatogramme.

Une répétition technique de chaque modalité a été mélangée aux autres répétitions de façon à obtenir un échantillon de référence, analysé à chaque début de journée. Ce contrôle permet de s'assurer de la répétabilité des mesures au cours du temps.

iii. Intégration des données

Grâce aux chromatogrammes, les différents pics correspondant aux COV sont visualisables.

Pour les identifier, le logiciel AMDIS et la librairie NIST ont été utilisés.

D'une part, le logiciel permet de travailler sur les pics d'intérêt (élimination du bruit de fond) et d'évaluer leur fiabilité (abondance des isotopes principaux de chacun des COV).

Ensuite, la librairie de NIST les compare à sa base interne et identifie les composés. Seuls les composés avec une probabilité d'être identifiés de façon juste supérieure à 70 % ont été retenus.

En année 1, 3 répétitions techniques ont été faites pour chaque modalité (durée et état sanitaire), soit 18 analyses au total.

En année 2, les 3 répétitions biologiques ont été répétées 2 fois ; soit 36 analyses au total.

iv. Réduction des données et analyse statistique

Pour analyser les résultats de l'analyse des COV sur les râpures de racine de betterave, le logiciel JMP a été utilisé (traitement des données fait en binôme avec le professeur référent). Cette analyse GC-MS ne permet pas l'acquisition de données absolues, la concentration de chacun des COV a donc été exprimée en fonction de la quantité totale de COV détectée (quantification relative).

Les variables à expliquer sont des COV ; et les variables explicatives sont des durées de stockage et des états sanitaires. Une cinquantaine de COV a été mesurée, pour 6 variables explicatives (4 durées de stockage et 2 états sanitaires). Une méthode d'analyse factorielle a été privilégiée pour le traitement de cette base de données.

Tout d'abord, l'analyse en composantes principales (ACP) a permis de décrire les différents échantillons et d'observer leur distribution sur un graphique à deux dimensions, en conservant

le maximum d'informations. Les données corrélées sont regroupées en composantes principales et permettent de décrire les corrélations entre les variables explicatives et les COV.

Le choix du nombre de composantes a été fait en fonction du pourcentage cumulé maximal de variabilité représenté par les axes factoriels. Cette étude représentant une phase exploratoire, lorsque les deux axes cumulent environ 50 % de la variabilité, ils ont été jugés suffisants.

Ensuite, la régression PLS a permis de simplifier d'autant plus le modèle, en ne conservant que les variables fortement corrélées entre elles. Les nouvelles variables sont des combinaisons linéaires des variables initiales sur lesquelles la variable réponse est régressée. Ici, seuls les COV aux comportements similaires et fortement corrélés aux variables explicatives sont sélectionnés. De ce fait, les COV identifiés par cette régression sont spécifiques des durées de stockage ou des états sanitaires étudiés.

2) Résultats et discussions

a. Les hexoses

À travers les analyses biochimiques réalisées dans le cadre de l'étude des changements au cours du stockage, il a été mis en évidence que les concentrations en hexoses seraient liées à l'état sanitaire des racines. Plus les racines sont contaminées, plus il y a de pathogènes et plus l'hydrolyse du saccharose dans les racines est importante.

En effet, avec un arrachage manuel, la production d'hexoses est nulle ou négligeable (cf. résultats hexoses du chapitre 2).

En s'intéressant à la corrélation entre les mesures d'IP (ou de taux de pourriture) et les mesures d'hexoses, il est effectivement observé que plus le développement de pourriture est élevé, plus fortes sont les concentrations en hexoses (voir la figure n°87).

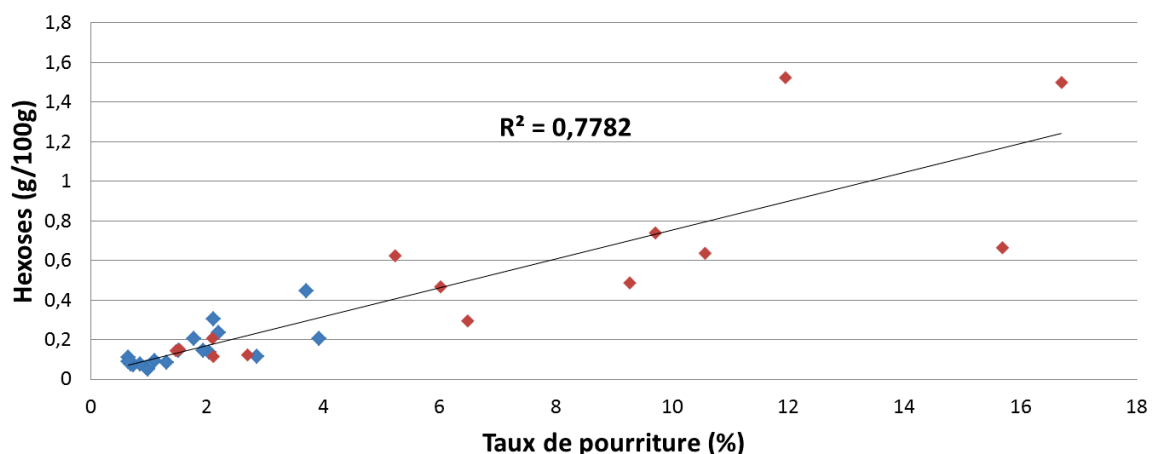


Figure n°87 : Corrélation entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.

Prélèvements de 212°j (semaine 3) à 406°j (fin de stockage).

Arrachage classique ↔ losanges bleus.

Arrachage agressif ↔ losanges rouges.

La corrélation entre les deux mesures est d'autant plus significative que le développement de pourriture est élevé. En année 2 de l'essai conservation/variétés, les mesures d'IP ont été plus élevées sur le site d'Origny que sur celui de Lillers, conduisant à une corrélation hexoses/IP plus forte en ne considérant que le site d'Origny (voir la figure n°88, à comparer avec l'annexe n°20).

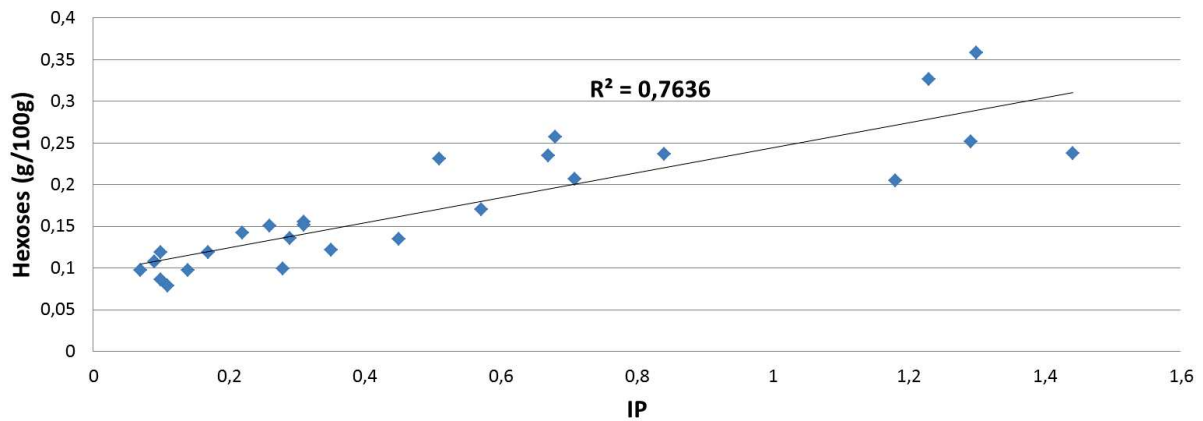


Figure n°88 : Corrélation entre la concentration en hexoses et l'IP au cours du stockage - Projet conservation/variété (année 2) – Arrachage mécanique – Origny. Prélèvements de 250°j à 500°j.

La corrélation est inexistante sur les sites dont les IP sont majoritairement inférieurs à 0,5, correspondant à des taux de pourriture inférieurs à 3 % (Lillers en année 2 ; voir l'annexe n°7 pour la correspondance entre IP et taux de pourriture).

De ce fait, pour évaluer la corrélation entre le glucose ou le fructose et le développement de pourriture, seuls les sites aux IP les plus élevés sont sélectionnés dans le cadre de l'essai conservation/variétés.

En étudiant individuellement les deux hexoses, il est observé que le glucose et le fructose sont tous deux corrélés au développement de pourriture (voir les annexes n°21a à n°21e). Ils représentent donc tous deux des indicateurs du développement de la pourriture.

Au regard de l'annexe n°21d, il semblerait que jusqu'à une concentration en glucose de 0,2 g/100g de matière fraîche, les contaminations soient majoritairement inférieures à un taux de pourriture de 4 %. Au-delà de cette concentration, les taux de pourriture varient de 6 % à 17% en fonction du cumul de température, et semblent caractéristiques d'un arrachage agressif (dans le cadre de l'essai CLD d'Origny 2016/2017).

Le seuil de 0,2 g/100 g de matière fraîche n'est pas dépassé dans l'essai conservation/variétés, à l'exception de l'année 1 (pour V1 en fin de stockage ; voir l'annexe n°21a notamment). En consultant les résultats d'analyse de qualité industrielle, il semblerait que les paramètres du procédé industriel ne soient pas altérés, mais que V1 présente la qualité industrielle la plus faible [cf. Thèse de C. Meade]. Comme cette variété est la plus sensible à la pourriture et qu'une corrélation significative est mesurée entre le glucose et le taux de pourriture, le seuil de 0,2 g/100 g pourrait être un indicateur de dégradation des racines, prévenant certains problèmes en usine.

Comme mentionné précédemment, le glucose est déjà mesuré aux laboratoires Tereos. Des analyses complémentaires alliant qualité agronomique et qualité industrielle pourraient être menées, de façon à déterminer une concentration en glucose limite pour laquelle la qualité industrielle des racines n'est pas préjudiciable pour le procédé. Le seuil de 0,2 g de glucose / 100g de matière fraîche pourrait alors être confirmé ou ajusté.

D'autres sucres, indicateurs d'une dégradation des racines plus prononcée, sont formés au cours du stockage ; l'un d'entre eux a été détecté dans le cadre de la thèse.

b. Un trisaccharide, indicateur de contaminations avancées

Avec la modalité arrachage agressif de l'essai CLD d'Origny et la méthode HPLC développée dans le cadre de la thèse, une nouvelle molécule a été détectée. Elle permet d'expliquer à plus de 70 % les pertes en saccharose de l'arrachage agressif et de compléter l'identification des autres transformations du saccharose au cours du stockage (cf. les figure n°84 et n°85).

Cette nouvelle molécule n'a été détectée que dans l'essai CLD d'Origny pour les modalités d'arrachages agressif et classique. Elle n'est ni présente dans les échantillons de l'essai conservation/varieties, ni pour la modalité d'arrachage manuel, probablement en raison d'un développement de pourriture plus faible (IP maximal de 1,5 ~ 10 % de pourriture pour l'essai conservation/varieties, contre 17 % pour l'essai CLD d'Origny).

Les analyses HPLC révèlent que la molécule a un temps de rétention similaire à celui du raffinose (voir la figure n°89). Il y a donc de fortes probabilités qu'elle soit assimilée à un trisaccharide. D'après les connaissances acquises au cours de la thèse, une recherche bibliographique et un test d'identification sur l'HPLC, cette nouvelle molécule pourrait être le kestose (cf. bibliographie).

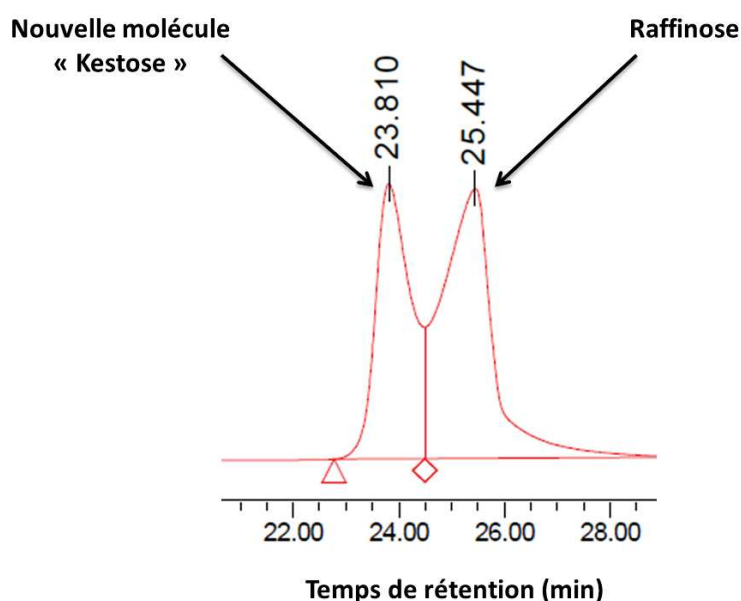


Figure n°89 : Extrait du chromatogramme des standards de kestose et raffinose.

Certains articles rapportent la synthèse de kestose par des pathogènes [Hankin et McIntyre, 1977]. Et dans sa cartographie microbiologique, C. Meade a identifié des bactéries lactobacilles capables de synthétiser le kestose, ou encore les champignons du genre *Aspergillus* [Korakli et al., 2003 ; Van Balken et al., 1991].

L'origine microbienne de la synthèse de kestose est renforcée par la découverte d'une enzyme au sein des racines capable de dégrader les fructanes. Il s'agit de la 6-FEH (Fructane ExoHydrolase), localisée dans les parois cellulaires des racines de betterave. Elle hydrolyse les liaisons β -2,6, caractéristiques du 6-kestose, neokestose et des levanes [Van den Ende et al., 2003, 2004]. Cette enzyme agirait alors comme une molécule de défense, en dégradant les produits formés par les pathogènes, dont le kestose fait partie.

La nouvelle molécule apparentée au kestose apparaît suite à un cumul de 314°j int. Elle stagne jusqu'à environ 350°j int avec un arrachage classique, alors que sa concentration est déjà multipliée par 8 avec un arrachage agressif. En fin de stockage, la teneur de cette molécule avec un arrachage agressif représente plus du double de celle de l'arrachage classique (voir la figure n°90).

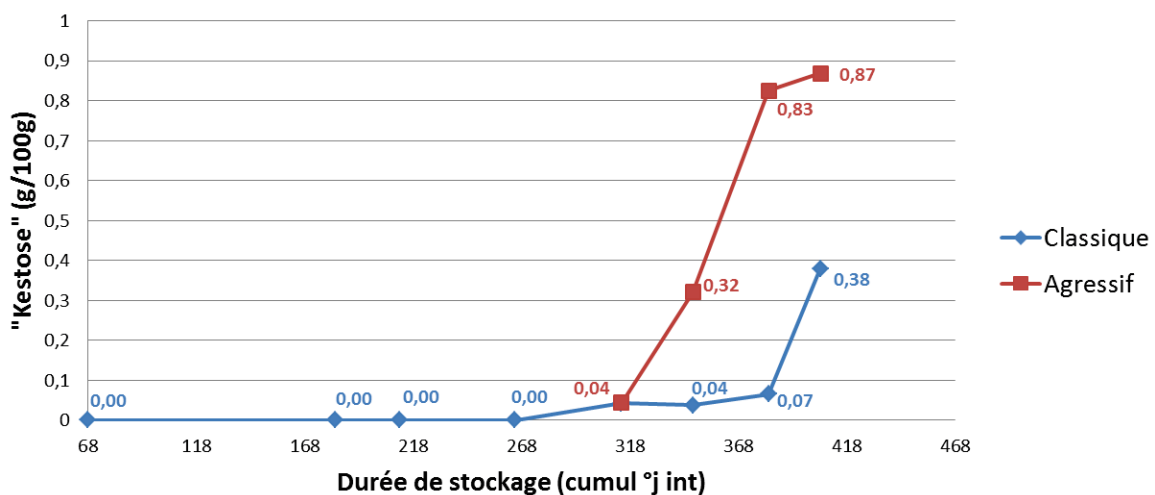


Figure n°90 : Concentrations de la molécule détectée au cours du stockage en fonction de l'arrachage - Essai CLD d'Origny.

Un point représente la moyenne de 3 sacs.

En complétant l'identification des pertes en sucre au cours du stockage (cf. chapitre 2), plus de 85 % des pertes en saccharose sont alors identifiées en arrachage classique et agressif (essai CLD d'Origny) grâce à l'identification de cette molécule par HPLC (voir les figures n°91 et n°92). 23 % des pertes de saccharose en arrachage agressif sont alors identifiées, en plus de celles mentionnées au chapitre 2.

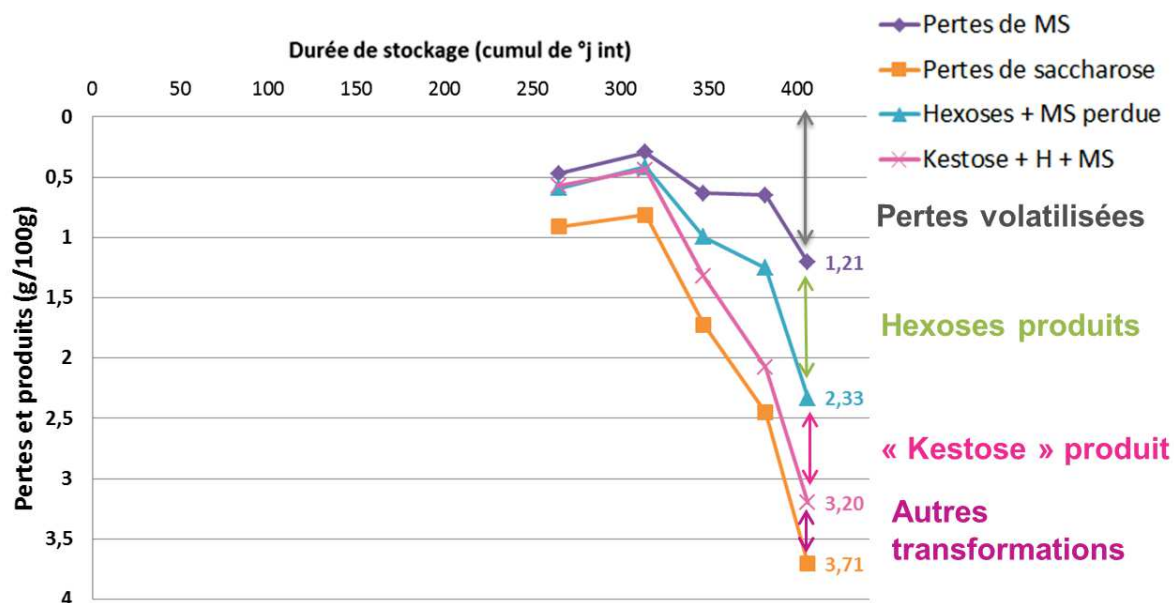


Figure n°91 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.
 MS ↔ Matière Sèche.
 H ↔ Hexoses.

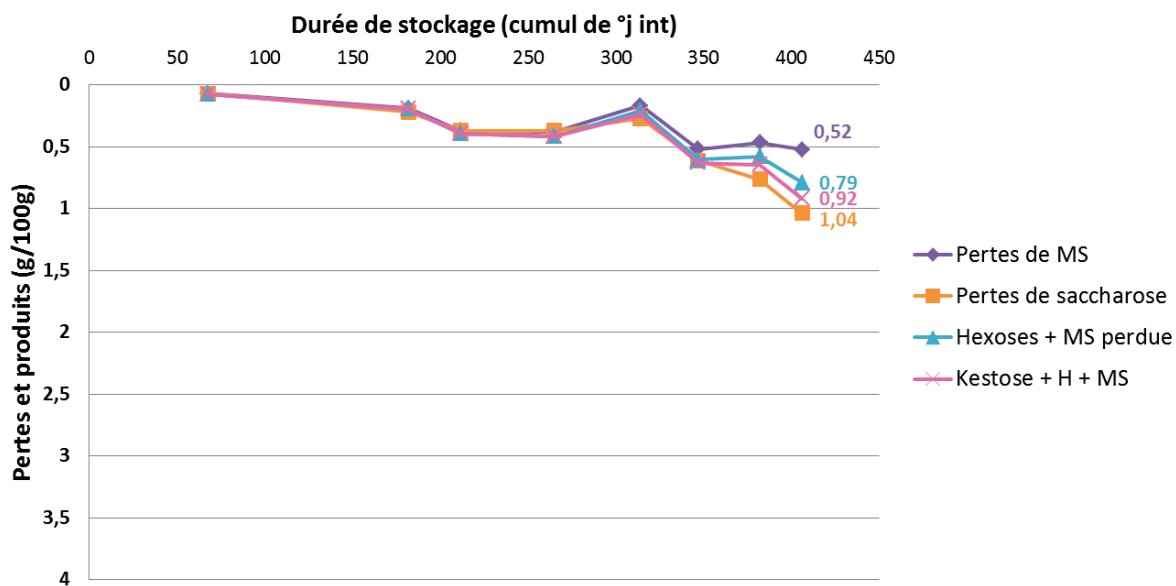


Figure n°92 : Identification des pertes en saccharose au cours du stockage - Essai CLD d'Origny – Arrachage classique.
 MS ↔ Matière sèche.
 H ↔ Hexoses.

En s'intéressant à la corrélation entre le taux de pourriture et la concentration de cette nouvelle molécule, un R^2 de 0,87 est obtenu (voir la figure n°93).

Cette molécule semble synthétisée pour un taux de pourriture supérieur à 3 %. Une corrélation significative entre la synthèse de cette molécule et le développement de pourriture est donc mesurée.

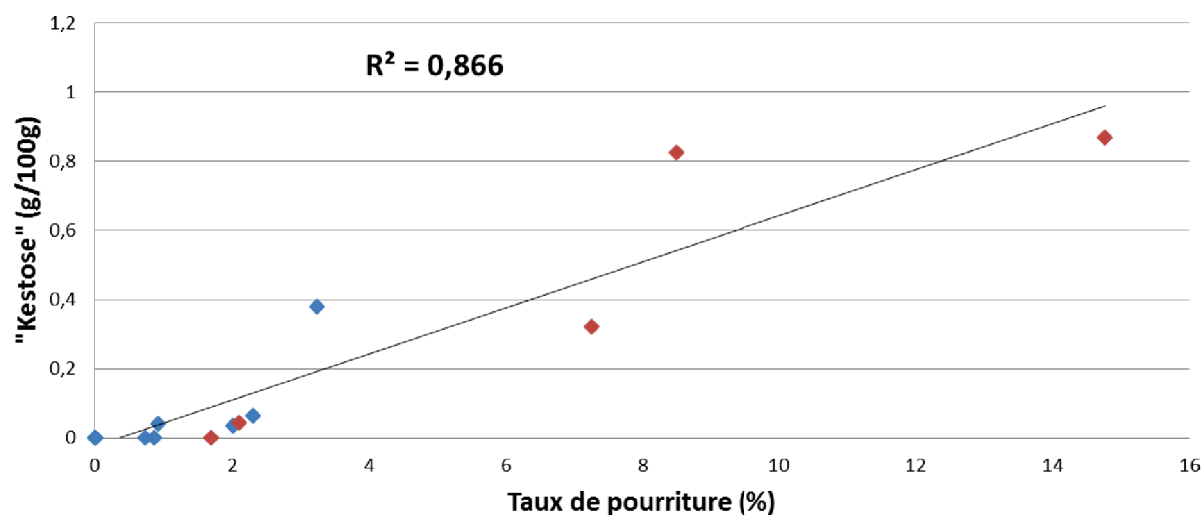


Figure n°93 : Corrélation entre la concentration en « kestose » et le taux de pourriture - Essai CLD d'Origny.

Arrachage classique ↔ points bleus.

Arrachage agressif ↔ points rouges.

La synthèse du « kestose » est ici accentuée lorsque le taux de pourriture est supérieur à 3 %. Si l'on compare les courbes de la figure n°90 avec celles du développement de pourriture de l'essai CLD d'Origny (cf. figure n°34), il est observé que la production de cette molécule à 314°j int pour l'arrachage agressif correspond à la première phase de croissance exponentielle des pathogènes. Pour l'arrachage classique, c'est la seconde phase de croissance exponentielle qui est associée à la production de « kestose ».

L'hypothèse d'une seconde croissance microbiologique aux alentours de 382°j int est ici appuyée. Pour un taux de pourriture inférieur à 3 %, un premier genre de contamination peut avoir lieu ; suivi d'une seconde contamination, au-delà de 3 %, du genre *Aspergillus*, ou autres micro-organismes, producteurs de kestose. Plus les racines sont blessées, plus les maladies se développent facilement au cours du stockage, et plus la molécule est synthétisée.

La production de « kestose » et les autres transformations subies par le saccharose au cours du stockage engendrent une perte de saccharose extractible par l'industrie. En éliminant la perte de MS et la production d'hexoses des pertes en saccharose, la corrélation entre la production de « kestose » et d'autres molécules et la perte en saccharose est retrouvée (voir la figure n°94).

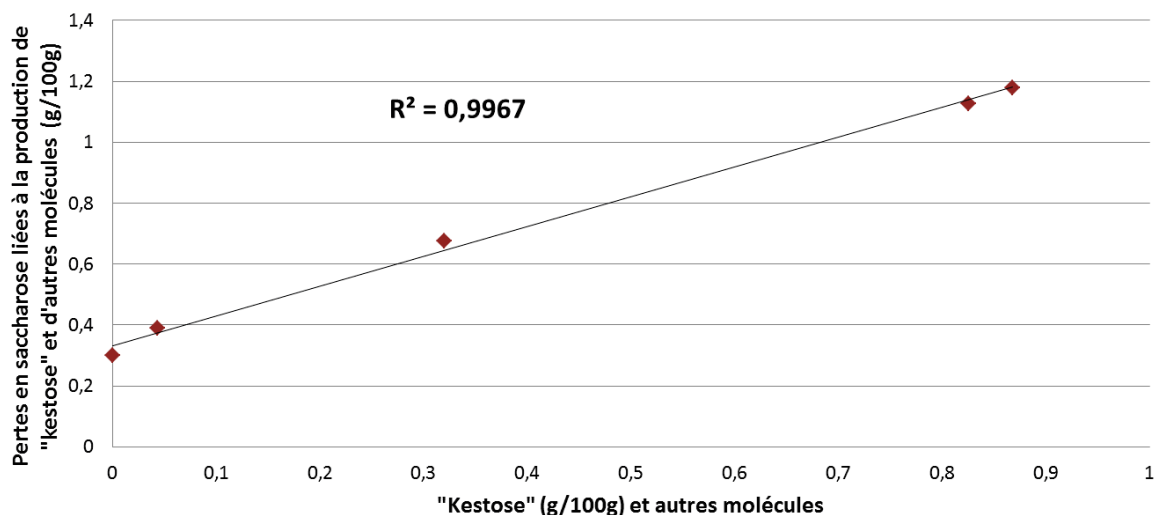


Figure n°94 : Corrélation entre la concentration en « kestose » et autres molécules et la perte en saccharose - Essai CLD d'Origny – Arrachage agressif.

Un point représente la moyenne de 3 sacs.

La production de 0,87 g de « kestose » et d'autres molécules pour 100 g de matière fraîche correspondrait à la perte d'environ 1,2 g de saccharose, pour 75 j de stockage avec un arrachage agressif. Soit une perte de saccharose de 160 g/T/j à ajouter aux pertes par respiration et par production d'hexoses. Ici, il s'agit de pertes moyennes, attribuées à la production de molécules autres que les hexoses, liées à un fort développement de pourriture. Sachant que les pertes liées à la production de « kestose » et d'autres molécules (« autres transformations » sur la figure n°91) correspondent à environ 37 % des pertes de saccharose totales, plus de 400 g/T/j de pertes en saccharose pourraient être enregistrés dans le cas d'un stockage de plus de 400°j int avec un arrachage agressif, comme mentionné dans le bilan des changements physiques et biochimiques de la thèse.

Le « kestose » est identifié ici comme indicateur de forte dégradation des racines, typique d'un arrachage agressif. Cette molécule est détectée par chromatographie. D'autres indicateurs, détectables par des outils plus pratiques adaptés à des mesures de terrain, ont été mesurés dans le cadre de la thèse. Il s'agit des composés organiques volatils (COV).

c. Les composés organiques volatils (COV)

i. Premiers tests et optimisation de la méthode d'analyse

L'analyse des COV sur racines de betteraves sucrières est un projet nouveau. Une première étape d'adaptation de la méthode HS-SPME GC-MS a donc été effectuée en octobre 2015.

Cette étape consistait à déterminer la forme sous laquelle les échantillons de racines devaient être réceptionnés au laboratoire (râpures congelées ou racines entières) ; déterminer également la meilleure solution tampon, inhibitrice d'activités métaboliques (NaCl ou CaCl₂) ; et optimiser le programme GC-MS. Ceci dans le but de savoir si des COV issus de racines de betteraves sont détectables.

Pour ce faire, des racines entières prélevées manuellement sur une parcelle à proximité d'Origny ont été utilisées. Une dizaine d'entre elles ont été conservées entières et lavées ; 25 autres racines ont été râpées (cf. M&M de l'essai CLD d'Origny du chapitre 2). Sorties de la râpe, les râpures ont été placées dans des barquettes et immédiatement plongées dans de l'azote liquide. Le transport des échantillons conditionnés dans de la carboglace jusqu'au laboratoire partenaire a été effectué le jour même.

Arrivées au laboratoire, les racines entières ont immédiatement été découpées en dés pour un broyage au T25 digital Ultra Turrax (de chez IKA ; voir annexe n°22a et n°22b). Trois tranches latérales, chacune provenant d'une racine, ont été prélevées sous le collet. Préalablement au broyage, une solution tampon a été ajoutée aux dés de racines. Un mélange a été effectué avec une solution de NaCl (1 mg/mL ; ratio 1 :1), et un autre mélange avec une solution de CaCl₂ (1 mg/mL ; ratio 1:1). Une fois le broyage effectué, les mélanges ont été répartis dans des tubes Falcon de 15 mL, plongés dans de l'azote liquide et placés à -80°C.

Pour ce qui est des râpures échantillonnées au laboratoire agronomique d'Origny, elles ont été décongelées pour la préparation de mélanges avec les solutions tampons. Deux ratios ont été utilisés : ratio 1:1 (50 gr de râpures mélangés à 50 gr de NaCl ou CaCl₂) et ratio 1:2 pour faciliter le prélèvement (25 gr de râpures mélangés à 50 gr de solution). Les mélanges ont ensuite été répartis dans des tubes Falcon de 15 mL, plongés dans de l'azote liquide et placés à -80°C.

La préparation des échantillons (extraction des jus) avant analyse est la même que celle décrite dans la partie M&M du chapitre 2.

L'analyse des échantillons a été initiée avec un temps d'incubation de 30 min à 40°C, un temps d'extraction de 30 min, un temps de refroidissement (après désorption) de 20 min et un temps d'analyse de 45 min.

Les premiers essais ont été faits avec les ratios 1:1. Une répétition du mélange de râpures avec la solution de NaCl obtenue avec le broyeur du laboratoire a été analysée, et deux répétitions de chacun des mélanges de râpures (avec NaCl et CaCl₂) issues de la râpe d'Origny également.

Au regard des premiers chromatogrammes, c'est avec la solution de CaCl₂ que les pics de COV sont les plus abondants. C'est cette solution qui a donc été sélectionnée pour la suite de l'optimisation. En effet, l'objectif est ici de détecter le maximum de COV. Par ailleurs, davantage de pics étaient attendus. Le temps d'extraction est alors ajusté à 1h. Un décalage dans le programme GC-MS est relevé. Le temps de refroidissement du système s'avère être insuffisant et est donc prolongé de 10 min.

Avec les ajustements, deux autres répétitions de chacun des mélanges avec les ratios 1:1 des râpures issues d'Origny ont été testées. La confirmation de pics plus abondants avec la solution de CaCl₂ est avérée. Quatre répétitions du mélange CaCl₂ avec le ratio 1:2 ont été analysées. Une répétition du mélange obtenu au laboratoire (à partir de racines entières) avec la solution de CaCl₂ a également été analysée.

Il s'avère que l'extraction des COV est meilleure avec une durée d'une heure et avec le mélange CaCl₂ (cf. les annexes n°23a et n°23b). Avec un temps de refroidissement de 30 min,

le programme GC-MS est correct. Pour une abondance de COV inchangée, le ratio 1:2 et le transport de râpure sont privilégiés ; l'aspect pratique n'est pas à négliger (cf. l'annexe n°23c).

Cette première période de tests a permis de définir un protocole d'échantillonnage optimal, de savoir que des COV sont détectables à partir de râpures de racines, et d'adapter la méthode GC-MS.

En 2016, au moment de la première campagne d'analyse, une seconde phase d'optimisation axée sur l'incubation a été menée. Il s'agissait de déterminer la durée de cette étape et à quelle température doivent être incubés les échantillons de râpures, de façon à maximiser la volatilisation des COV avant l'adsorption sur la fibre.

Les durées de 15, 30 et 45 min, et les températures de 30, 40 et 50°C ont été testées. Trois répétitions pour chacune des modalités ont été effectuées (soit 27 analyses).

La durée de 45 min paraissait optimale : meilleure reproductibilité et représentativité des résultats. Avec 15 et 30 min, la phase volatile n'était pas stable et une faible reproductibilité a été observée (cf. l'annexe n°24a).

La température de 40°C paraissait optimale. À 30°C, l'extraction n'est pas optimisée (petits pics), et à 50°C, malgré des pics élevés, il y a le risque d'oxydation de COV (cf. l'annexe n°24b).

C'est grâce à ces travaux d'optimisation que le M&M de l'analyse des COV à partir de racines de betteraves a pu être établi.

ii. Au cours du stockage

En année 1, 52 COV ont été sélectionnés pour la description de la variabilité des échantillons ; 48 COV en année 2. Ils ont été sélectionnés en fonction de leur probabilité d'être identifiés à plus de 70 % avec la bibliothèque du NIST, et avec l'expérience de la technicienne dans l'analyse des COV.

En raison d'un échantillonnage plus précis en année 2, de répétitions techniques plus nombreuses et de l'expérience de l'année 1, les COV cités ci-après sont principalement ceux issus des analyses de l'année 2. Comparés à l'année 1, les COV principaux sont retrouvés mais les tendances sont plus nettes en année 2 (disparition ou production au cours du stockage).

De plus, les différences variétales de l'année 2 n'apparaissent pas significatives de J0 à 350°j int. Les résultats des deux variétés ont donc été regroupés pour renforcer les données par date de prélèvement (en année 1, uniquement V1, cf. M&M). Un point sur les différences en fin de stockage entre les 2 variétés de l'année 2 est proposé ultérieurement.

En considérant les valeurs absolues (issues de l'intégration des pics formés par les COV sur les chromatogrammes), il est observé une variation de la quantité totale de COV entre le jour de la récolte et la fin du stockage (voir la figure n°95). Jusqu'à 350°j int, une diminution de la quantité totale de COV est observée, alors qu'à plus de 450°j int elle est multipliée par 1,5 comparée à la quantité initiale (par 3 comparé à 350°j int).

Il est à supposer que les COV de J0 sont consommés pendant la première phase de stockage, et qu'à partir d'un stockage de 450°j int, de nouveaux COV sont synthétisés. Dans le cadre de notre étude, la réduction de la quantité de COV de J0 à 350°j int peut s'expliquer par le changement d'environnement de la racine. Une fois en silo, elle n'a plus besoin de communiquer avec le sol pour optimiser son développement et la racine va alors conserver ses réserves de carbone pour la cicatrisation de ses blessures et sa respiration principalement. L'augmentation de la quantité totale de COV à partir de 450°j int peut s'expliquer par le développement de pourriture, qui induit un stress oxydant dans les racines. Les COV libérés vont alors jouer le rôle de molécules régulatrices de ce stress, ou encore de molécules de signalisation pour alerter les autres racines du danger [Jansen et al., 2011]. Ils peuvent également être la résultante de la fermentation microbienne.

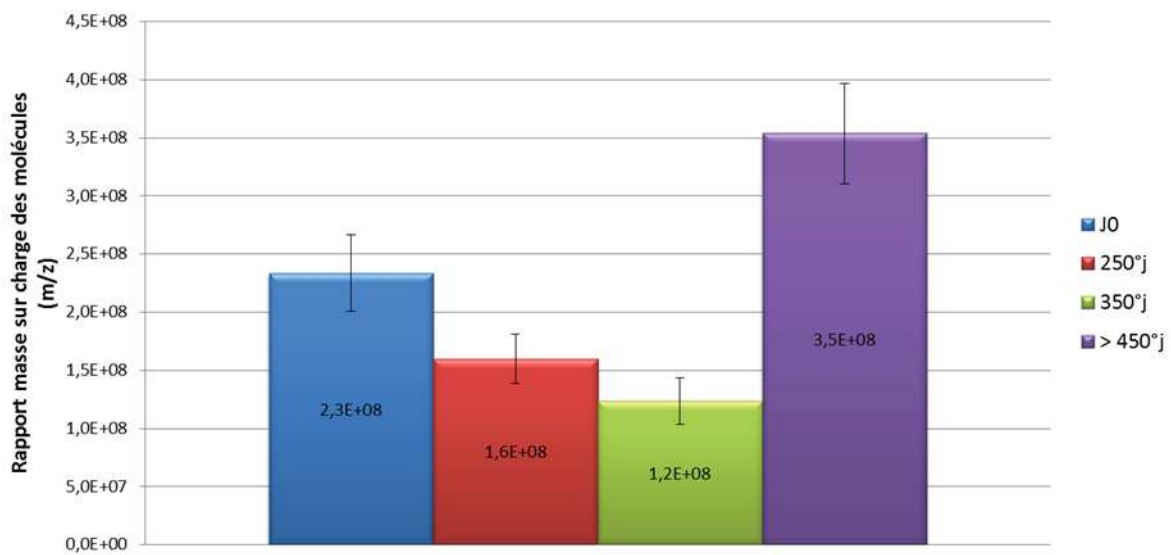


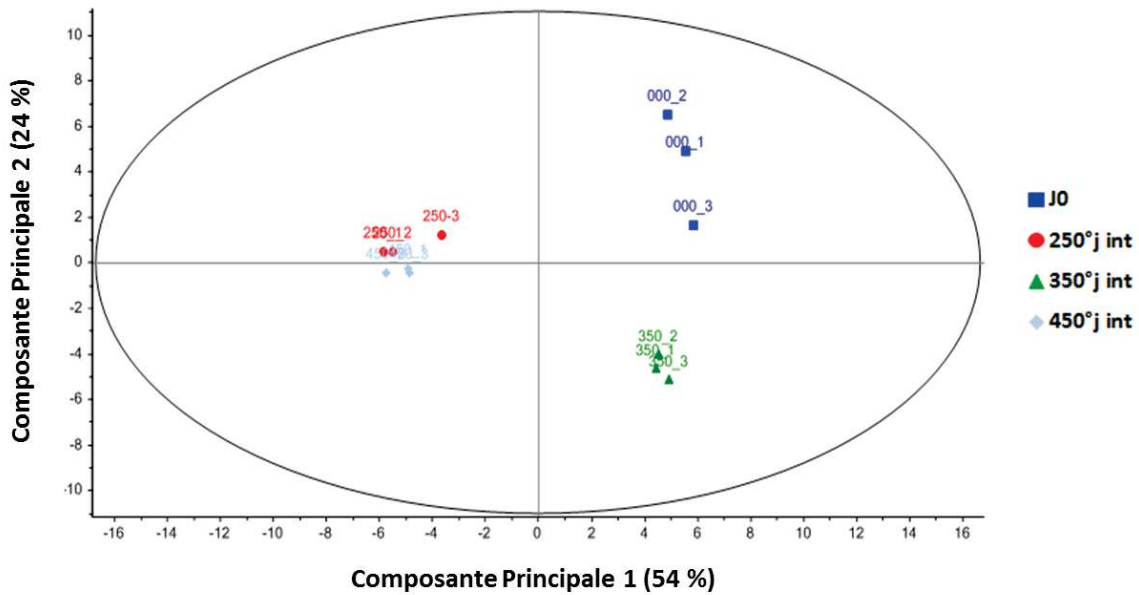
Figure n°95 : Quantité totale de COV en fonction de la durée de stockage – Moyenne sur les deux années (en excluant le prélèvement à 250°j int de l'année 1).

Note : L'analyse des COV sur racines de betteraves est un projet nouveau. La méthode d'analyse a nécessité une intégration manuelle des pics résultant du chromatogramme. Pour ces raisons, les barres d'erreur ont été représentées sur les graphiques illustrant les résultats des analyses des COV. Elles représentent les écarts-types des mesures.

Suite à l'ACP, les variables à expliquer sont regroupées en composantes principales (CP). Celles-ci regroupent les COV aux comportements similaires et permettent alors de simplifier l'explication du modèle. Les échantillons sont représentés sous forme de « score plots » selon un espace en deux dimensions représentant les deux CP.

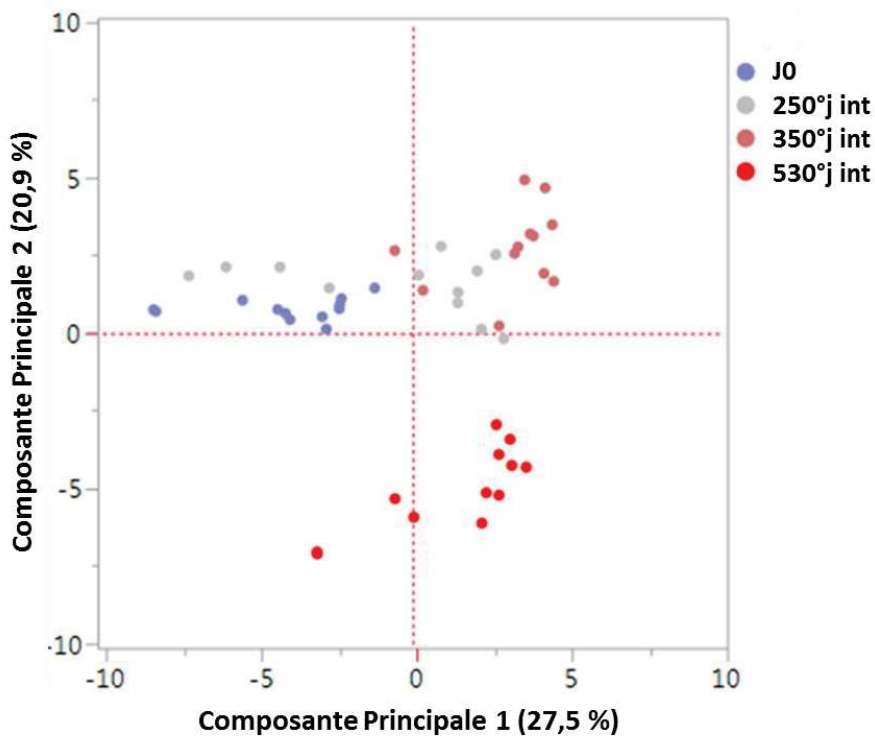
En année 1, les deux CP décrivent 78 % de la variabilité ; en année 2 : 48,4 % (voir les figures n°96a et n°96b). Cette représentation permet d'observer la répartition des échantillons suivant les deux CP. En année 1, une erreur d'échantillonnage expliquerait la répartition des échantillons de 250°j int (oxydation trop importante, variation des COV non attendue et description proche des échantillons de fin de stockage ; voir la figure n°96a et l'annexe n°25). Pour le reste des échantillons, il est observé une progression des échantillons de J0 à 350°j int selon l'une des deux CP (CP 2 en année 1 ; CP1 en année 2), et un décrochement des

échantillons de fin de stockage selon l'autre CP (CP1 en année 1 ; CP2 en année 2). Cette observation signifie que la composition des échantillons stockés jusqu'à environ 350°j int peut être décrite par le même groupe de COV ; alors que la composition des échantillons de fin de stockage se distingue des autres échantillons et est décrite par un autre groupe de COV.



a) Année 1 (Figure n°96)

Une erreur d'échantillonnage explique la répartition des échantillons de 250°j int



b) Année 2

Figure n°96 : Analyse des COV dans le temps – Représentation en « score plots » des échantillons selon les deux composantes principales (résultat de l'ACP).

En s'intéressant à la composition des deux CP décrites précédemment, des COV présents naturellement, dits constitutifs des racines saines, et des COV dits induits, caractéristiques des racines de fin de stockage (produits suite aux contaminations) ont pu être identifiés.

Un aldéhyde, l'hexanal, est présent dans la majeure partie de la composition des échantillons à la récolte (environ 40 % en moyenne de la totalité des COV sélectionnés en année 2 pour les deux variétés ; voir la figure n°97).

Au cours du stockage, les COV majoritaires du début de stockage diminuent (l'hexanal et l'acétone notamment) pour laisser place à des esters, tels que l'acétate d'éthyle et de méthyle, et au benzaldéhyde principalement (voir la figure n°97).

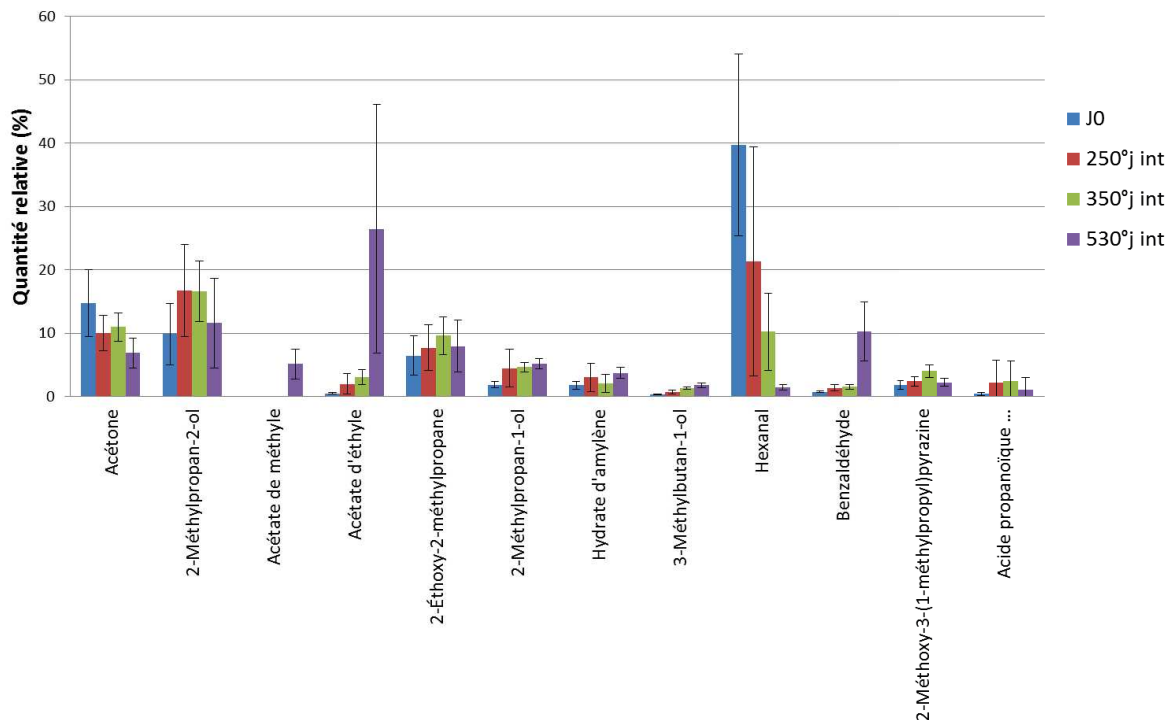


Figure n°97 : COV majoritaires du stockage des racines – Essai conservation/variétés année 2 – Regroupement des résultats de V1 et V2.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des mesures.

L'hexanal est caractéristique d'odeurs fruitées, voire terreuses ; c'est un arôme naturel de nombreux fruits et légumes [Schade et al., 2003]. D'autres composés, tels que l'acétone et le 2-méthylpropan-2-ol, contribuent également à la majeure partie de la description de la composition des échantillons du jour de la récolte (voir l'annexe n°26 qui regroupe également les résultats obtenus sur racines saines). Les propriétés anti-oxydantes de l'acétone sont rapportées par certains articles. Elles seraient générées par la stimulation des enzymes de type catalase et peroxydase notamment [Ghareib, 2010].

L'acétate d'éthyle qui apparaît comme le composé majoritaire de la fin du stockage, résulte de la combinaison de l'acide acétique et de l'éthanol. Les levures de types *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de le synthétiser [Howard and Anderson, 1976]. Ces levures ont été identifiées dans la cartographie microbiologique de la thèse partenaire. À noter qu'avec

l'épandage des vinasses pratiqué sur les parcelles de betteraves, une contamination du sol par ces levures est possible puisqu'elles sont utilisées en distillerie.

Le benzaldéhyde est caractéristique d'une odeur d'amande amère et de certains fromages. Il serait produit par différentes souches de bactéries lactobacilles, via la voie des cétoacides [Groot and Bont, 1998 ; Tracey and Britz, 1989 ; voir l'annexe n°27]. Ces bactéries ont également été identifiées dans la cartographie microbiologique.

Avec l'analyse des moindres carrés partiels, de nouvelles composantes, appelées facteurs principaux, sont définies. Elles regroupent les COV aux tendances similaires regroupés dans les CP précédentes, avec en plus la particularité d'être spécifiques aux différents points de prélèvement.

Dans cette étude, l'identification d'indicateurs de dégradations (contaminations) potentiellement détectables (fortes proportions privilégiées) est l'objectif principal. En s'intéressant aux résultats de fin de stockage, plusieurs COV sont identifiés comme spécifiques de la dégradation des racines (voir la figure n°98).

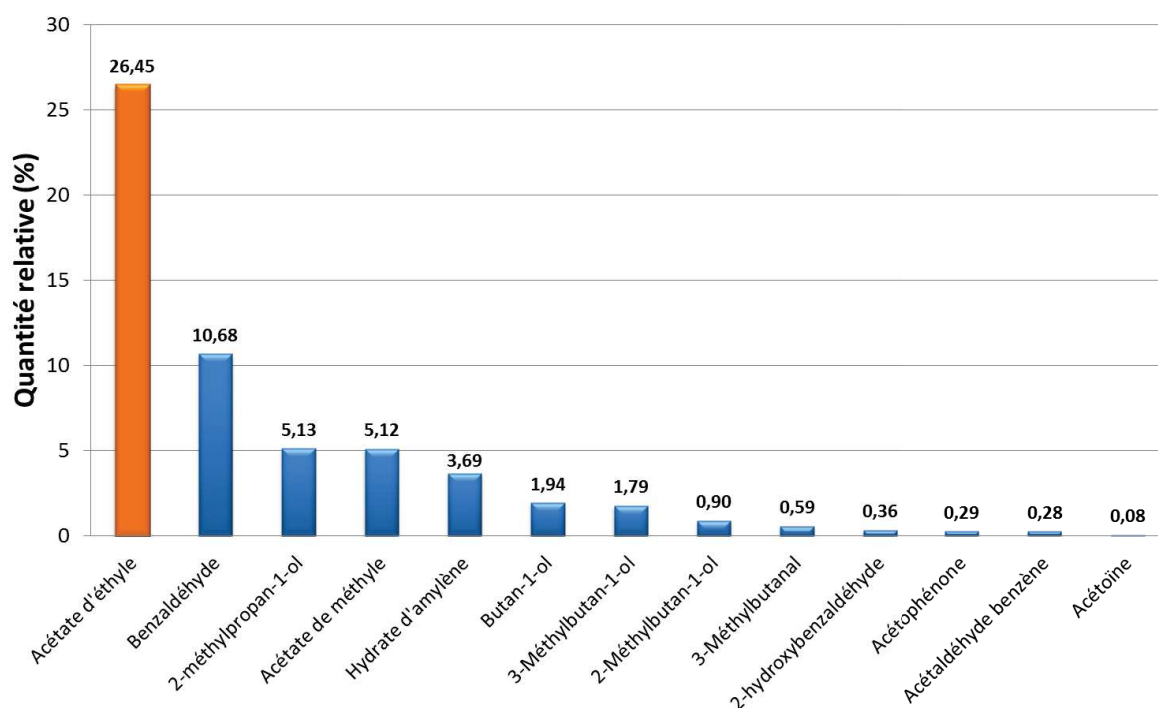


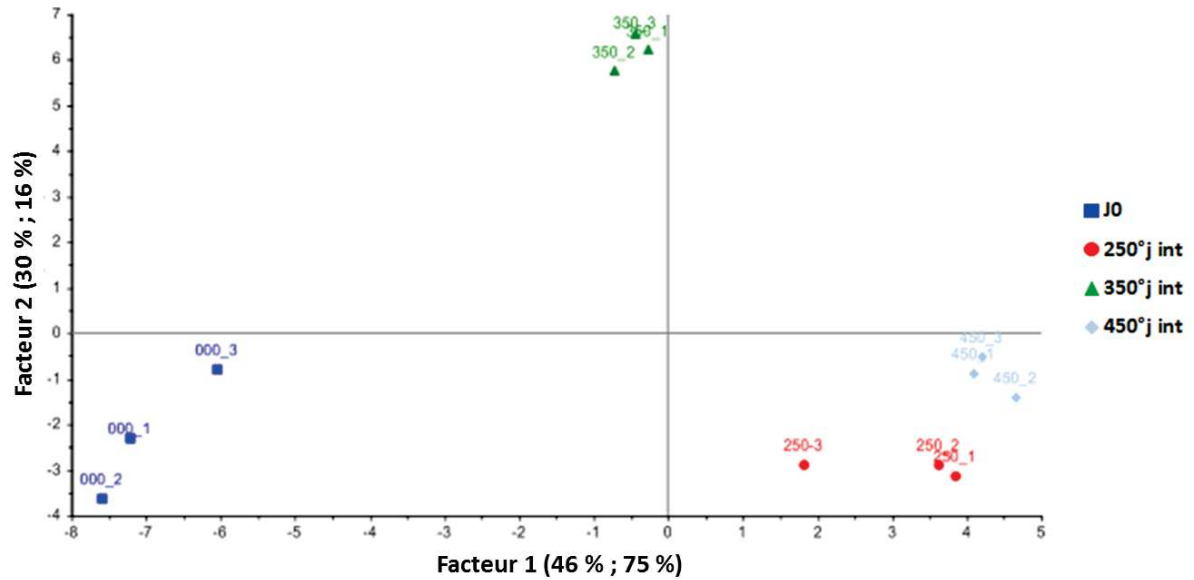
Figure n°98 : COV spécifiques de la fin de stockage (500°j int) – Essai conservation variétés (année 2) – Moyenne des 2 variétés.

Comme pour l'ACP, les échantillons de fin de stockage se distinguent des autres prélèvements (hormis l'erreur d'échantillonnage à 250°j int en année 1). Cette observation sous-entend des groupes de COV différents entre le début et la fin de stockage. Certains COV seraient alors spécifiques de la dégradation des racines.

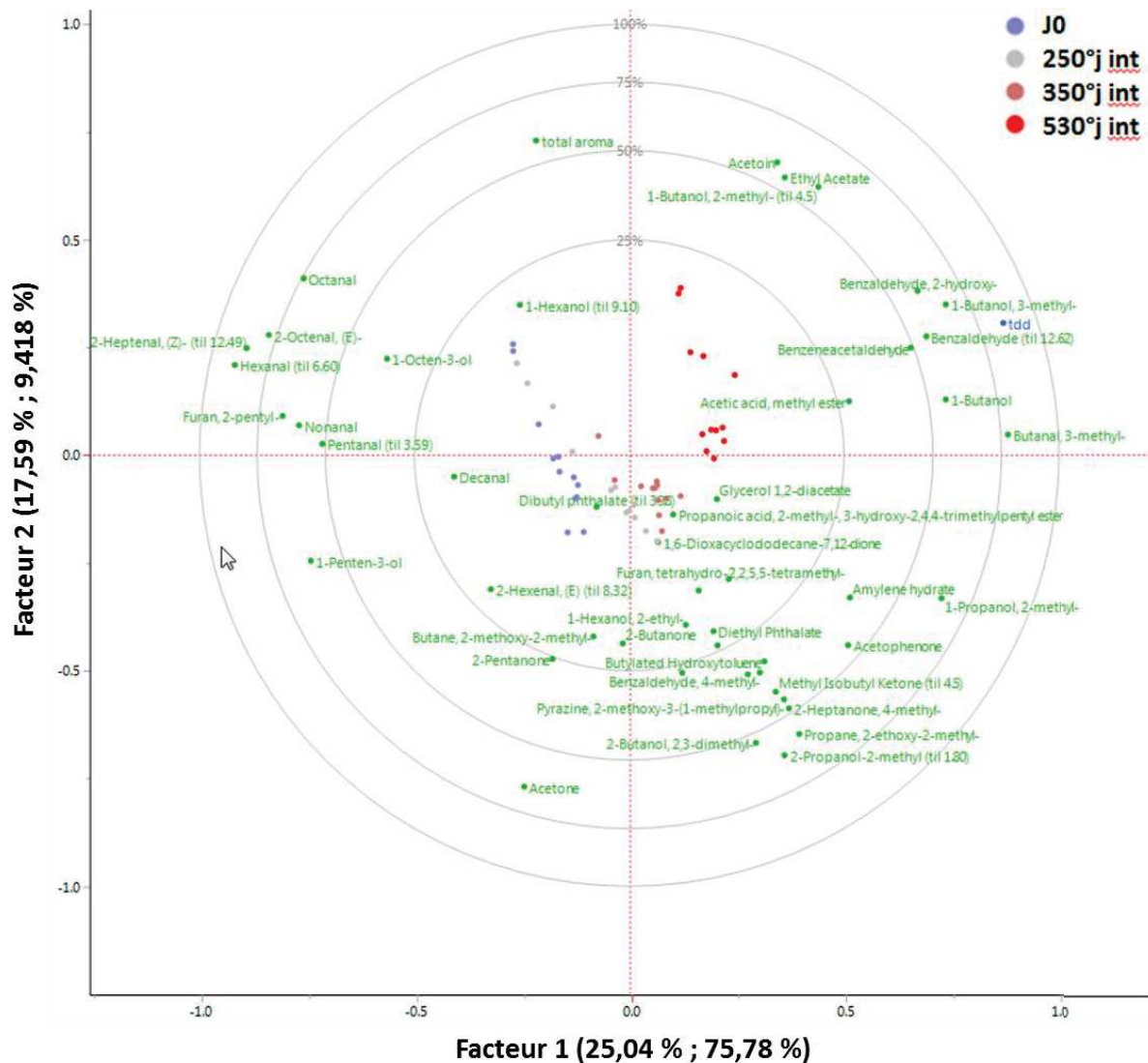
Pour les deux années, la composition des échantillons de J0 à 350°j int semble progresser selon l'axe vertical ; alors que celle des échantillons de fin de stockage semble principalement décrite par l'axe horizontal (erreur d'échantillonnage à 250°j int en année 1, voir les figures

n°99a et n°99b). Les deux facteurs participent à l'explication de la composition des échantillons, en plus forte proportion pour le facteur 1 sur les deux années.

Les deux facteurs sélectionnés dans cette étude décrivent 76 % du modèle et expliquent 91 % de la variabilité des échantillons en année 1 ; en année 2, ils décrivent 42,6 % de la variabilité et en expliquent 85,2 % (voir les figures n°99a et n°99b).



a) Année 1 (Figure n°99)



b) Année 2 – COV spécifiques des échantillons en vert.

Figure n°99 : Analyse des COV dans le temps – Résultats de la méthode PLS – Représentation en « score plots » des échantillons selon les deux facteurs principaux.

Sur la figure n°99b, les COV spécifiques de la fin de stockage sont identifiés (et représentés avec la figure n°98). Il s'agit principalement d'alcools, dérivés du butane-1-ol (le 2-méthylpropan-1-ol est un isomère du butanol) ; d'esters, comme les acétates d'éthyle et de méthyle ; et de benzaldéhyde.

La production des isomères du butanol se retrouve également être issue du métabolisme de *S. cerevisiae* [Steen et al., 2008]. Ces levures sont capables de produire ces alcools par la dégradation de la thréonine, via la voie des cétoacides [Schadeweg and Boles, 2016 ; Shi et al., 2016 ; Si et al., 2014 ; voir l'annexe n°27].

Les COV de fin de stockage semblent produits par fermentation, résultant du développement de pourriture observé dans les résultats du chapitre 2.

Les concentrations d'acétate d'éthyle et de benzaldéhyde augmentent avec la durée de stockage, alors que l'acétate de méthyle n'apparaît qu'en fin de stockage et semble donc spécifique d'une forte dégradation des racines (voir la figure n°97).

L'acétate de méthyle est caractéristique d'une odeur amère. Ce composé est synthétisé par la réaction entre l'acide acétique et le méthanol en condition de températures élevées. Il peut être supposé ici qu'en raison de l'accumulation de méthanol au cours du stockage, celui-ci devient disponible à partir de 530°j int pour être métabolisé, et réagir ainsi avec l'acide acétique, au même titre que l'éthanol. En effet, au cours du stockage, la quantité d'oxygène disponible au cœur des silos diminue et des conditions anaérobiques sont créées, favorables aux contaminations microbiologiques. Les bactéries notamment, produisent par fermentation de l'acide acétique, de l'éthanol et du méthanol. Ici, il est supposé que l'éthanol est plus facilement disponible (moins volatil que le méthanol), et réagit immédiatement avec l'acide acétique pour produire l'acétate d'éthyle, le composé majoritaire des échantillons de fin de stockage (et des racines malades ; voir les résultats ultérieurs). En fin de stockage, où la fermentation est plus importante, le méthanol serait produit en proportions suffisantes pour réagir également avec l'acide acétique et former ainsi l'acétate de méthyle. Une autre hypothèse serait que les bactéries présentes en fin de stockage métabolisent plus facilement le méthanol.

Comme mentionné précédemment, un point est fait sur les différences variétales.

Suite aux résultats de l'ACP, les différences entre les deux variétés ne semblent pas significatives de J0 à 350°j int, mais se dessinent pour les échantillons de fin de stockage (voir la figure n°100).

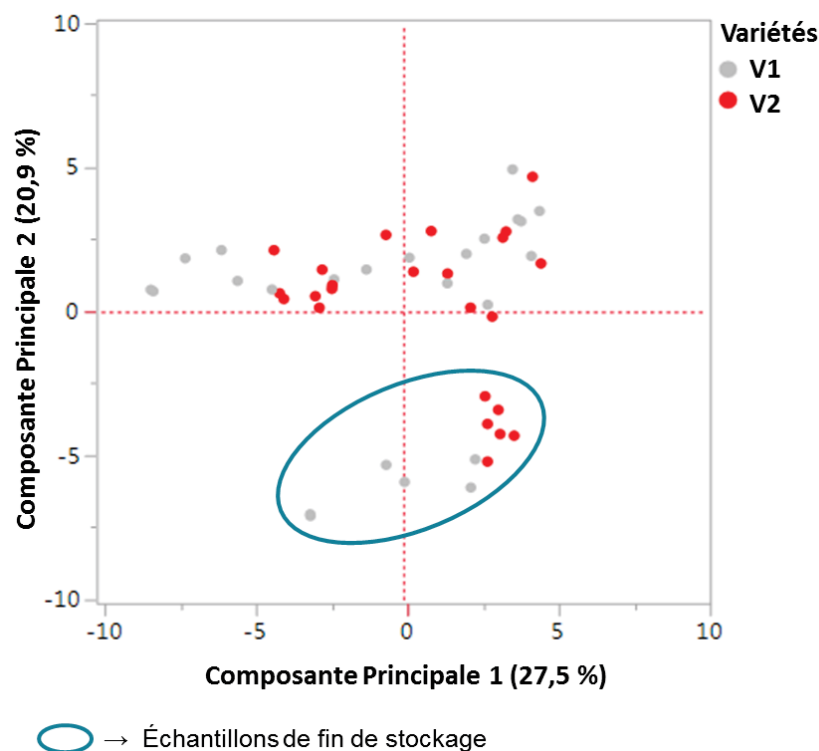


Figure n°100 : Résultats de l'ACP des COV par variété au cours du stockage – Représentation en « score plots » des échantillons en fonction des deux CP - Année 2.

En regardant de plus près les résultats de fin de stockage des deux variétés, il est observé une production d'acétate d'éthyle plus importante pour la variété 1, alors que la variété 2 produit davantage d'acétate de méthyle et de benzaldéhyde (voir la figure n°101).

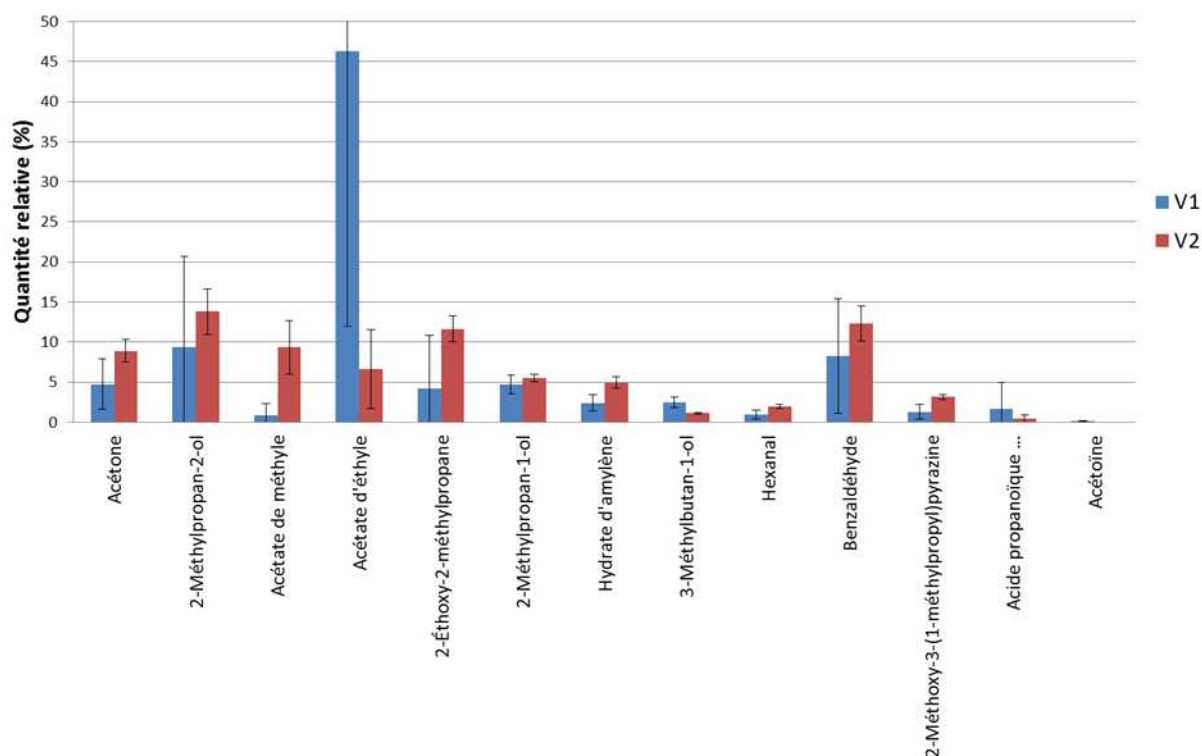
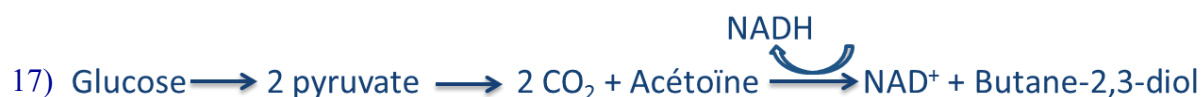


Figure n°101 : COV majoritaires en fin de stockage en fonction de la variété – Année 2.
Les barres d'erreur représentent les écarts-types des mesures.

En se référant aux caractéristiques variétales (cf. M&M du chapitre 2) et aux résultats du chapitre 2, la variété 1 est plus sensible au développement de pourriture que la variété 2. L'IP de V2 à 530°j int est plus de deux fois moins élevé que celui de V1 (0,4 pour V2 contre 0,96 pour V1). La croissance microbologique est alors plus faible pour V2 et les espèces en présence peuvent alors être différentes d'une variété à l'autre (compétition entre espèces). Les espèces présentes chez V2 en fin de stockage seraient alors capables de métaboliser plus facilement le méthanol. Dans la littérature, les bactéries de genre *Pseudomonas*, par exemple, [Freeman et al., 1976], et les champignons *Rhizopus arrhizus* et certaines espèces du genre *Aspergillus* seraient capables de synthétiser l'acétate de méthyle [Langrand et al., 1990]. En fin de stockage, ces espèces seraient alors présentes en majorité chez V2, alors que V1 serait contaminée par d'autres organismes favorisant la production d'acétate d'éthyle, comme *S.cerevisiae*.

Une autre différence entre les deux variétés en fin de stockage est l'apparition d'acétoïne chez V1 (retrouvée sur les deux années, et également sur racines malades ; voir les annexes n°28a et n°28b). D'odeur fade, voire grasse, l'acétoïne est le produit de l'oxydation du butane-2,3-diol en conditions anaérobiques par les levures du genre *S. cerevisiae* notamment [Romano and Suzzi, 1996]. Le butane-2,3-diol est produit par la fermentation du glucose (voir l'équation 17).



D'autres bactéries, du genre *Clostridium* et *Bacillus* sont également capables de synthétiser le butane-2,3-diol [Syu, 2001]. L'acétoïne serait donc également le résultat de fermentations.

L'acétate de méthyle et l'acétoïne, caractéristiques de la fin de stockage, pourraient être de potentiels indicateurs d'une forte dégradation des racines.

En s'intéressant aux quantités relatives des COV majoritaires de la fin de stockage, c'est l'acétate d'éthyle qui apparaît être le composé présent en plus forte proportion (voir la figure n°98). Il pourrait être considéré comme un COV cible dans la détection de la dégradation des racines, via un outil de type nez électronique.

iii. Comparaison des racines saines et malades

En moyenne sur les deux années, la quantité de COV détectée sur racines malades est plus de deux fois plus élevée que sur racines saines (voir la figure n°102).

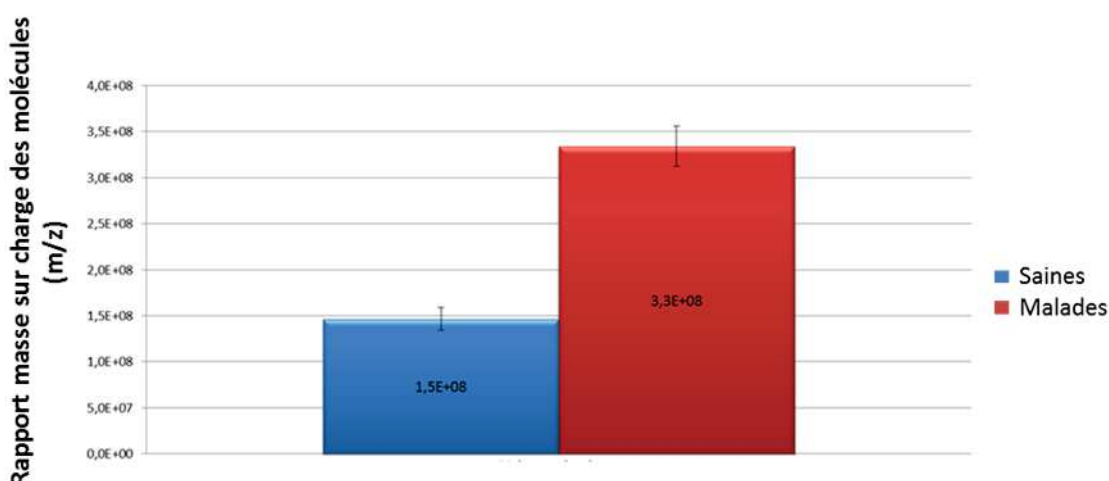


Figure n°102 : Racines saines et malades – Quantité totale de COV détectée en fonction de l'état sanitaire des racines (moyenne sur les deux années).

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des mesures.

En s'intéressant à la composition des groupes de COV, il est observé que les racines malades se caractérisent par une forte présence d'acétate d'éthyle et d'alcools pour les deux années (voir la figure n°103).

Les racines saines se décrivent par l'acétone et le 2-méthylpropan-2-ol principalement, en année 2 (voir la figure n°104). Les mêmes COV que ceux identifiés en début et en fin de stockage sont également identifiés respectivement sur racines saines et malades.

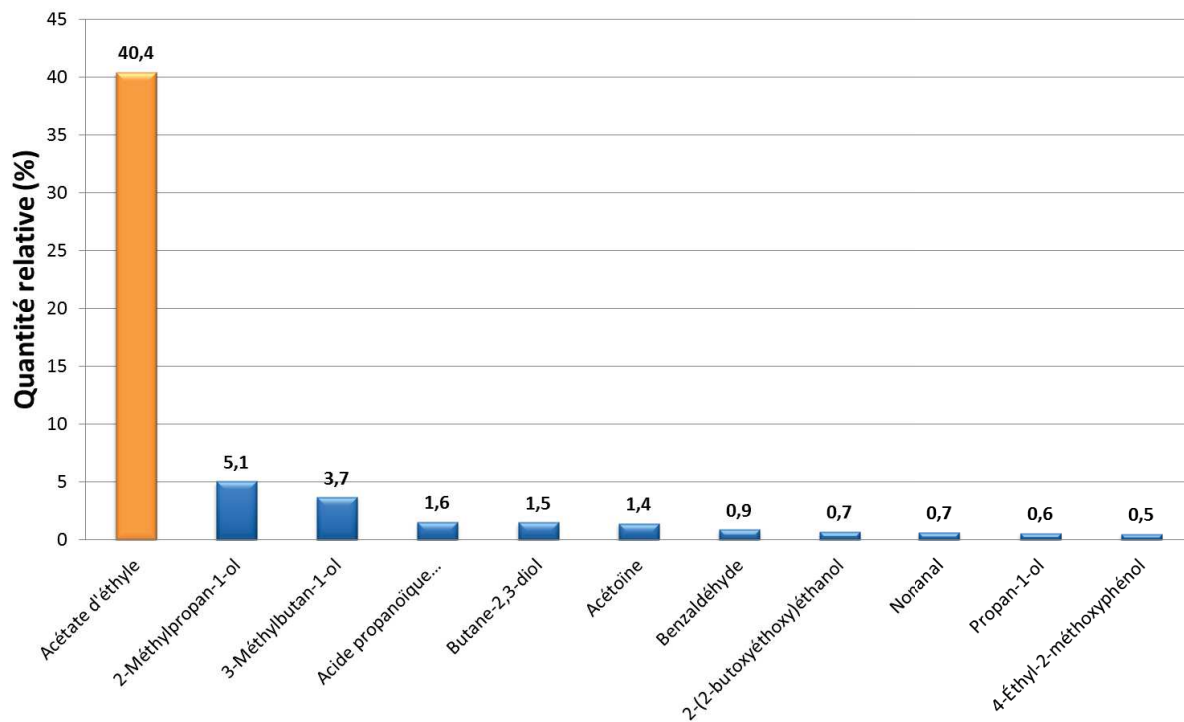


Figure n°103 : COV majoritaires caractéristiques des racines malades (année 2).

Note : Acide propanoïque... ↔ 3-Hydroxy-2,4,4-triméthylpentyl, 2-méthylpropanoate

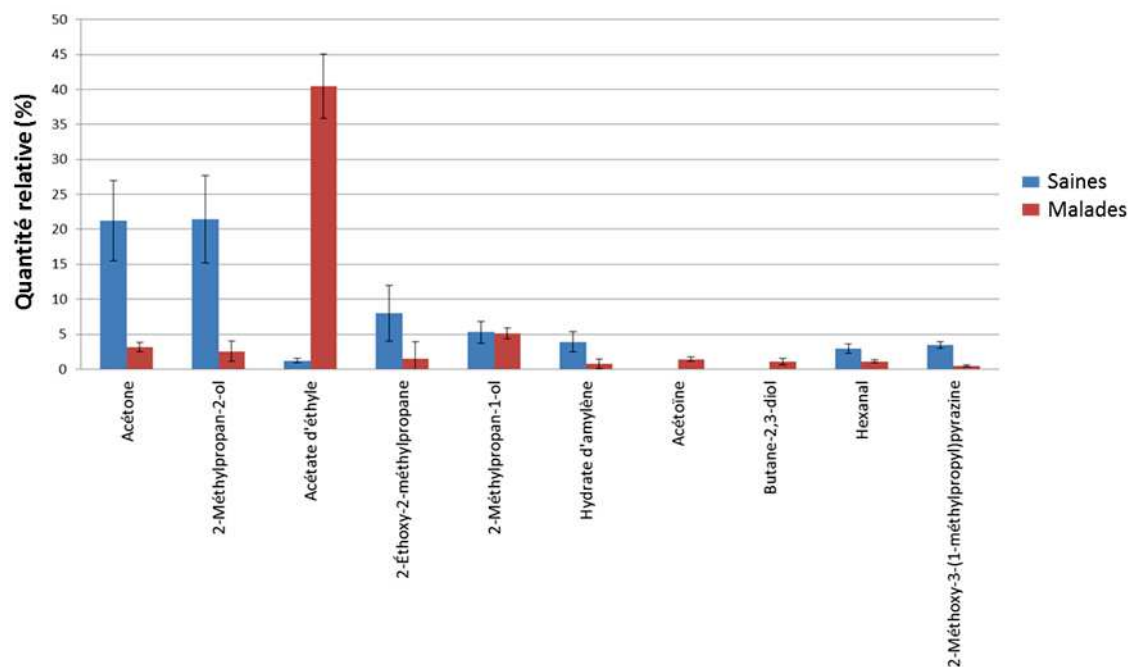


Figure n°104 : COV majoritaires des racines saines et malades – Année 2.

Les barres d'erreur représentent les écrats-types des mesures.

Comme la description de l'état sain a été faite précédemment avec celle des échantillons du jour de la récolte, cette partie traite de la description des échantillons malades.

Il est retrouvé les mêmes composés qu'en fin de stockage. L'acétate d'éthyle explique la majeure partie de la composition des échantillons contaminés (voir la figure n°103).

Les composés dérivés du butanol sont également présents, avec l'identification du butane-2,3-diol ici. Il a été vu que l'oxydation de ce composé est réversible, et conduit à la synthèse d'acétoïne, retrouvée également dans les racines malades (voir l'équation 17).

Une nette distinction est observée entre les deux types d'échantillons sur les deux années avec l'ACP. La représentation selon un espace en deux dimensions permet d'observer que les deux états sanitaires se situent chacun de part et d'autre de l'axe vertical (voir la figure n°105). Les deux états sanitaires ne se décrivent donc pas par les mêmes groupes de COV. Les deux composantes principales décrivent plus de 70 % de la variabilité des résultats (en année 1 également).

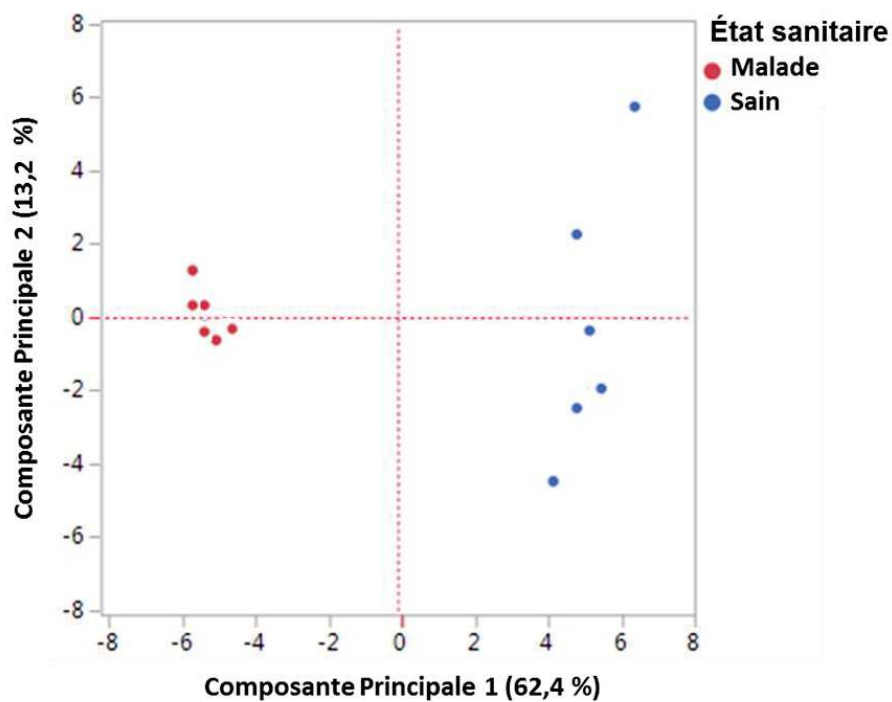
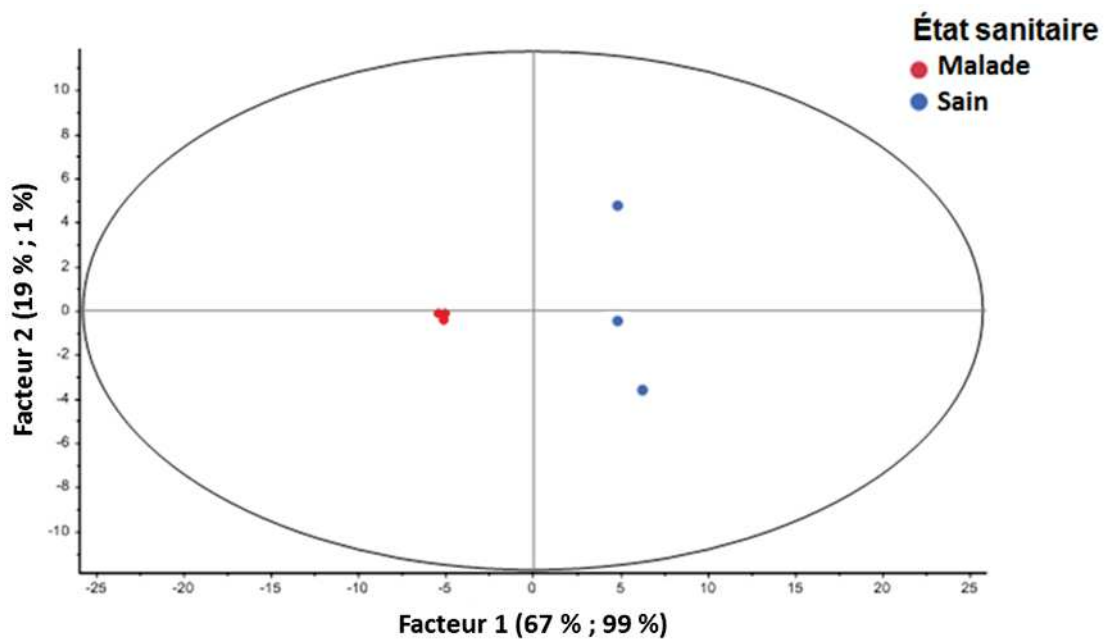
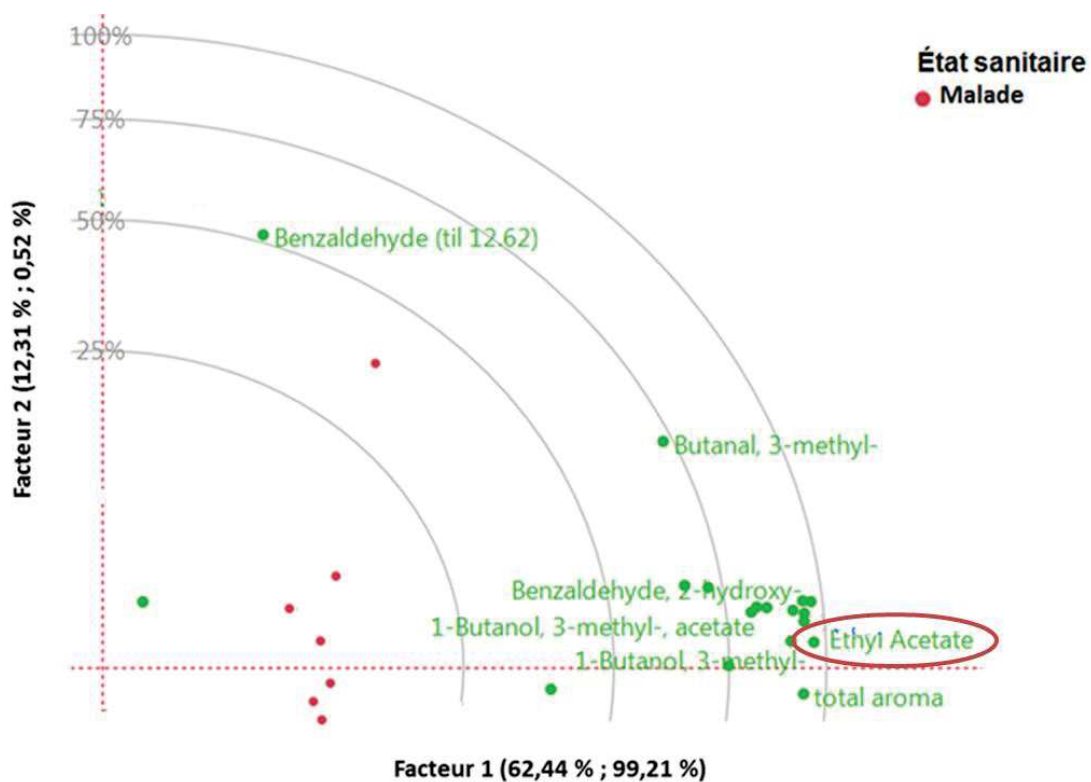


Figure n°105 : Représentation en « score plots » des résultats de l'ACP des échantillons sains et malades selon les deux composantes principales – Année 2.

Avec la régression PLS, les deux facteurs principaux expliquent plus de 99 % de la variabilité des résultats (voir les figures n°106a et n°106b). Les COV spécifiques aux deux états sanitaires ont ainsi pu être identifiés. L'acétate d'éthyle est fortement corrélé aux échantillons malades (voir la figure n°106b).



a) Année 1



b) Année 2

Figure n°106 : Représentation en « score plots » des résultats de la méthode PLS des échantillons sains et malades selon les deux facteurs principaux – Année 2.

Il a été vu précédemment que les COV caractéristiques de la dégradation des racines peuvent être produits par une levure. Ici, la maladie de la racine violette causée par un champignon est identifiée (voir la figure n°86).

Même si les informations issues de la bibliographie ne renseignent pas sur les COV produits par ce genre de champignon, il est à supposer que les levures ne seraient pas les seules responsables de la production des COV identifiés dans le cadre de cette étude.

iv. Bilan des analyses de COV

La nature et la quantité des COV émis par les racines varient en fonction de leur durée de stockage, et de leur état sanitaire.

Il est observé une évolution de la composition des échantillons du jour de la récolte jusqu'à un cumul d'environ 500°j int, et une nette différence de nature des COV entre les échantillons sains et malades est également observée.

En début de stockage, comme dans les racines saines, des aldéhydes, des cétones et quelques alcools décrivent en majorité la composition des COV. Il s'agit, entre autres, de l'hexanal, de l'acétone et du 2-méthylpropan-2-ol. Ces composés sont caractéristiques d'odeurs douces et fruitées, voire terreuses [Burdock, 2010].

Pour les échantillons de fin de stockage et de racines malades, des esters, des alcools, quelques acides, des aldéhydes et des cétones sont présents en majorité. L'acétate d'éthyle représente plus de 40 % de la composition en COV en fin de stockage de V1 et chez les racines malades. Pour V2, en plus de l'acétate d'éthyle, d'autres composés expliquent 40 % de la composition de fin de stockage : le 2-méthylpropan-2-ol, le benzaldéhyde, le 2-éthoxy-2-méthylpropane et l'apparition de l'acétate de méthyle.

Certains COV ne semblent apparaître qu'en cas de fortes dégradations des racines, et ne se retrouvent qu'en fin de stockage ou chez les racines malades. Il s'agit de l'acétate de méthyle, de l'acétoïne, et du 2,3 butanediol principalement.

Dans l'objectif d'identifier des COV indicateurs de dégradations (contaminations), il est intéressant d'évaluer la corrélation entre les deux composés majoritaires de la fin de stockage et des racines malades, et l'indice de pourriture.

La corrélation entre l'acétate d'éthyle et l'IP se devine, tout comme celle entre le benzaldéhyde et l'IP (voir les figures n°107 et n°108). Ces deux composés évolueraient dans le même sens que le développement de pourriture et seraient de potentiels indicateurs de dégradations des racines.

En s'intéressant aux résultats d'IP au cours du stockage et aux concentrations de l'acétate d'éthyle et de méthyle, et du benzaldéhyde, il est observé que plus l'IP est fort et plus les concentrations de ces COV sont élevées (voir la figure n°109).

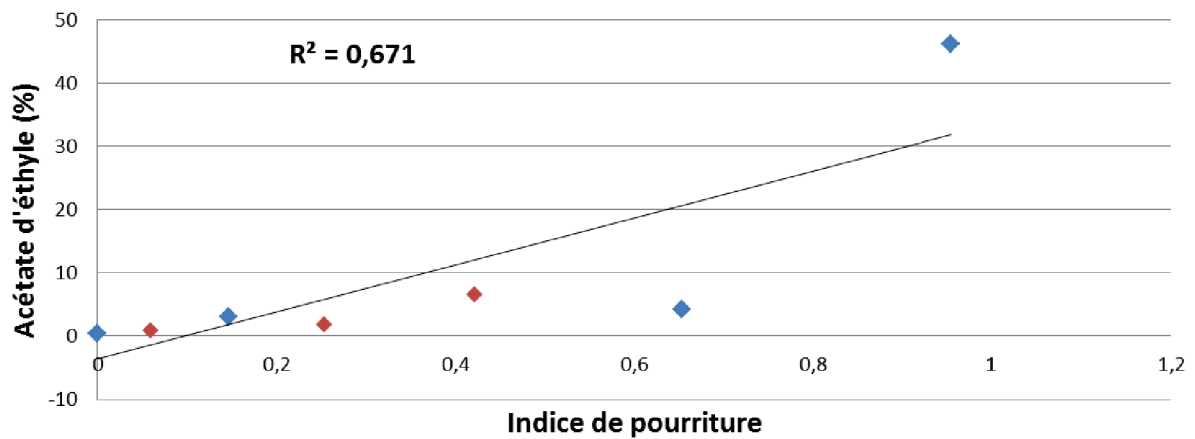


Figure n°107 : Corrélation entre l'acétate d'éthyle et l'IP en fonction de la variété – Essai conservation/variétés (année 2).

Points bleus : V1.

Points rouges : V2.

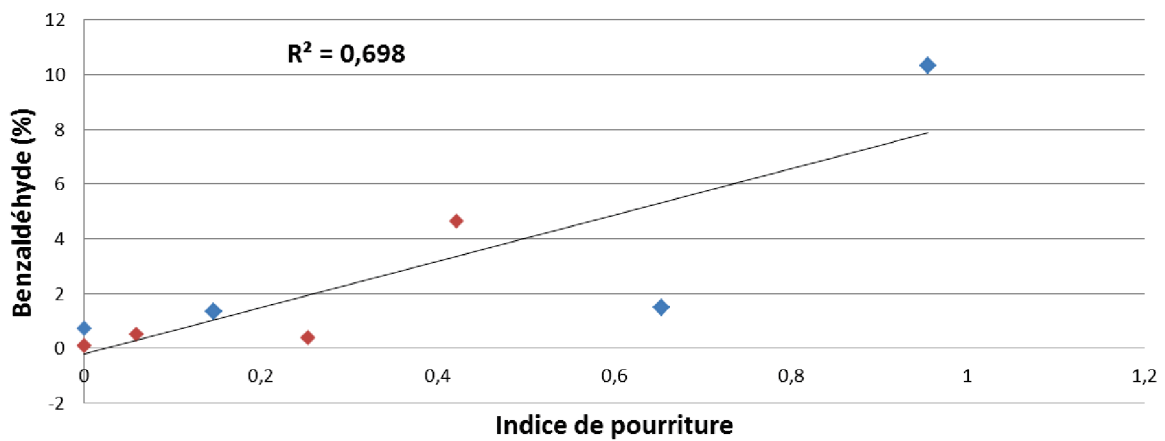


Figure n°108 : Corrélation entre le benzaldéhyde et l'IP – Essai conservation/variétés (année 2).

Points bleus : V1.

Points rouges : V2.

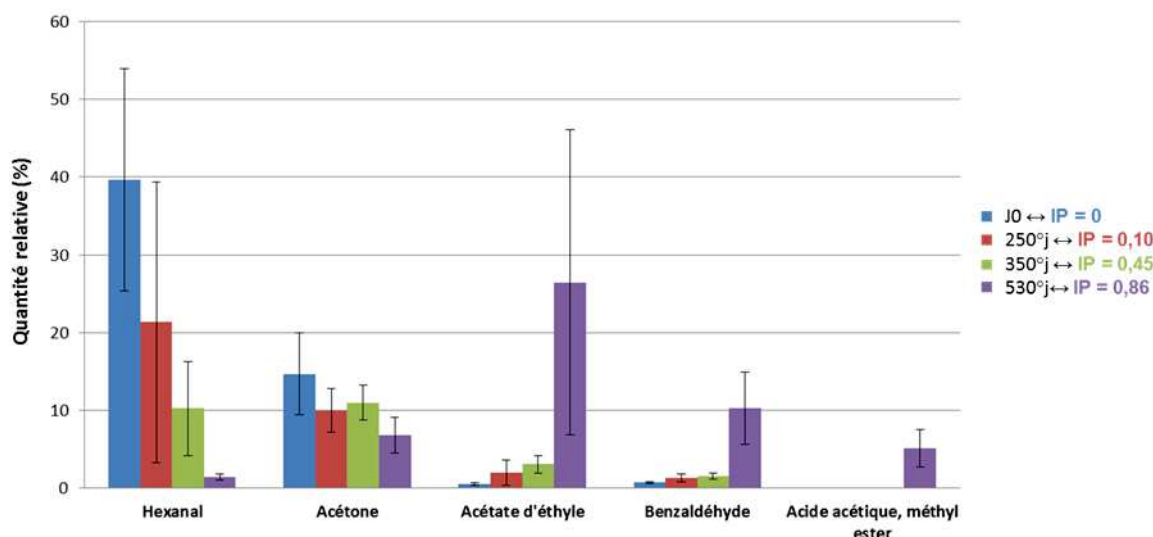


Figure n°109 : COV principaux présents au cours du stockage en lien avec l'évolution de l'indice de pourriture (IP) – Année 2 - Regroupement des deux variétés.

L'hexanal quant à lui, a une évolution inverse de celle de l'IP (voir les figure n°109 et n°110). En présence de pourriture, ce COV semble être dégradé.

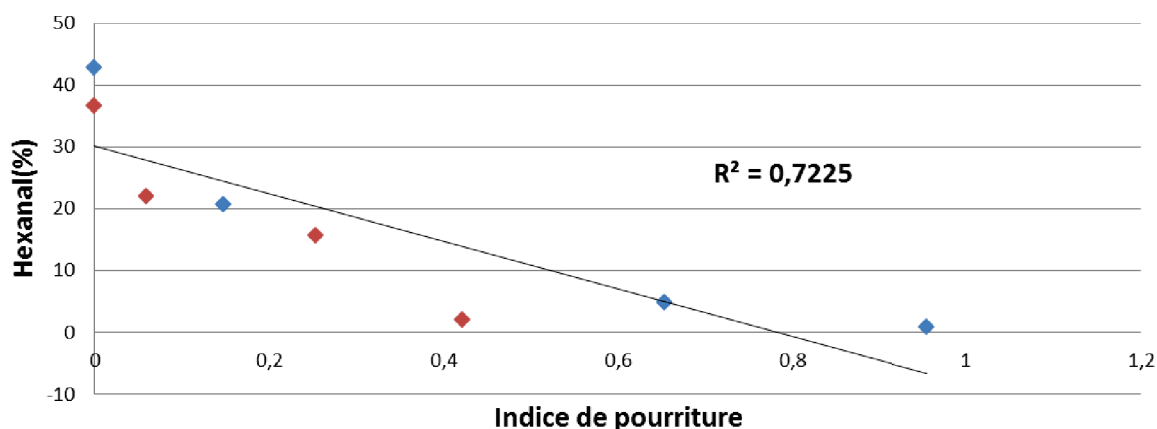


Figure n°110 : Corrélation entre l'hexanal et l'IP – Essai conservation/variétés (année 2)
Points bleus : V1.
Points rouges : V2.

Comme vu précédemment, l'hexanal fait partie des COV constitutifs des racines. Il est identifié comme le COV majoritaire des racines saines, analysées immédiatement après la récolte. Les racines communiquent avec leur environnement de façon à assurer leur développement et à prévenir d'éventuelles contaminations. La propriété antimicrobienne de l'hexanal est relatée dans plusieurs articles, et sa production pourrait faire partie de la stratégie de défense des plantes pendant leur développement en sol [Lanciotti et al., 2004 ; Seethapathy et al., 2016 ; Thavong et al., 2011]. Au moment de l'arrachage, les racines subissent un stress, plutôt qualifié d'abiotique avec le changement d'environnement. Afin de préserver leurs

réserves de carbone, elles ne produiraient plus d'hexanal et concentreraient leur énergie dans l'adaptation de leur métabolisme à l'environnement en silo, et la cicatrisation des blessures.

Dans l'optique de la mise en place d'outils pratiques, l'acétate d'éthyle pourrait être proposé comme COV cible. Sa concentration augmente au cours du stockage, et il est mesuré comme COV majoritaire en fin de stockage et chez les racines malades ; il semble donc être un potentiel indicateur de dégradation mesurable.

En partant du postulat que l'hexanal est le COV majoritaire des racines saines, après récolte, et que sa concentration diminue au cours du stockage et en présence de maladie, il pourrait également être utilisé comme indicateur de dégradation des racines. Un seuil de concentration minimal pourrait être défini, en-dessous duquel il pourrait être considéré que les racines sont en cours de dégradation.

3) Conclusion sur les indicateurs de contaminations des racines et perspectives

La recherche d'indicateurs de dégradations des racines est adaptée à la prévention des pertes de saccharose au cours du stockage. L'analyse de racines fortement blessées (arrachage agressif de l'essai CLD d'Origny), de racines malades ou encore stockées à plus de 450°j int a conduit à l'identification de potentiels indicateurs, évoluant dans le même sens que le développement de pourriture.

Tout d'abord les hexoses, également identifiés dans le chapitre 2.

Le glucose et le fructose sont les produits directs de la dégradation du saccharose et leurs concentrations évoluent avec le développement de la pourriture. Les hexoses sont des marqueurs de contaminations microbiologiques en raison de leur production par les pathogènes. La dégradation du saccharose par les micro-organismes commence par l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, et est ensuite poursuivie par la transformation du glucose en d'autres molécules, adaptées au métabolisme propre de chaque pathogène.

Des analyses HPLC ont également été effectuées sur les échantillons sains et malades prélevés pour les analyses de COV. Avec la maladie, la concentration en hexoses est multipliée par 10 comparée aux racines saines (voir l'[annexe n°29](#)).

La corrélation positive entre les hexoses et le développement de pourriture démontre leur capacité à indiquer l'état de dégradation des racines. Le glucose est déjà mesuré au laboratoire agronomique de Tereos.

En se projetant sur un contrôle pratique de l'état sanitaire des silos, un moyen de mesure rapide et fiable des concentrations en glucose serait idéal. Un prélèvement de liquide à partir de racines semble difficile, mais l'utilisation d'outils de type scanners, basés sur la fluorescence ou encore l'absorbance de bio-senseurs de glucose (enzymes ou cofacteurs), pourrait être adaptée à la détection rapide de silos en cours de dégradation. D'autres essais pourraient être prévus dans l'objectif de déterminer une valeur cible de glucose, au-dessus de laquelle les racines seraient considérées en état de dégradation.

Un trisaccharide a également été identifié. Il s'agit probablement du « kestose », synthétisé par des pathogènes de type lactobacilles ou encore *Aspergillus*. Ce composé serait indicateur d'une forte dégradation des racines. En effet, il est principalement détecté avec un arrachage agressif et un taux de pourriture de fin de stockage avoisinant les 10 %.

L'identification de métabolites spécifiques de la dégradation du saccharose par des pathogènes est un outil supplémentaire. En effet, même si les concentrations en hexoses augmentent avec les contaminations microbiologiques, le glucose et le fructose sont naturellement présents dans la racine. Ici, il s'agirait de molécules exogènes à l'organisme de la racine, ou du moins, caractéristiques d'une dégradation prononcée.

La mesure de telles molécules dans les racines est la preuve de la présence de pathogènes et, comme certaines sont spécifiques à des organismes en particulier, ces molécules peuvent représenter des indicateurs-clefs du type de dégradation subi par les racines. Au niveau industriel, l'identification des espèces microbiologiques en présence est une information essentielle pour l'amélioration du pilotage du procédé industriel lors du passage de racines malades. Dans la thèse partenaire, il est mis en valeur l'importance de la connaissance des espèces microbiologiques néfastes au procédé industriel, de façon à identifier des solutions adaptées et applicables en usine (pH et T°C principalement). De ce fait, les inconvénients engendrés par de fortes contaminations pourraient être limités, d'une part, en évacuant rapidement les silos concernés, et d'autre part, en appliquant des solutions adaptées au niveau du procédé industriel.

Dans la recherche d'innovations, des composés organiques volatiles ont été mesurés.

Au cours du stockage et en cas d'infection par des pathogènes, les racines émettent des COV résultant du développement de pourriture. Des isomères du butanol ont été identifiés, l'acétoïne également, ainsi que les acétates d'éthyle et de méthyle, et le benzaldéhyde.

L'acétate d'éthyle occupe la majeure proportion des COV sélectionnés présents en fin de stockage et chez les racines malades.

Le point de départ de la synthèse de l'ensemble de ces COV est le glucose, produit par la dégradation du saccharose. Avec l'identification des COV produits par la dégradation des racines, les pathogènes susceptibles d'être à l'origine de ces productions pourraient être identifiés. Les métabolismes de dégradation du saccharose pourraient alors être approfondis, afin d'aller plus loin dans la compréhension du catabolisme du saccharose au cours du stockage et chez les racines malades. La levure *S. cerevisiae* et les bactéries de type lactobacilles semblent impliquées dans la production de ces COV par l'utilisation de la voie des cétoacides (voir [l'annexe n°27](#)).

Pour l'industrie sucrière en recherche de nouveaux outils, l'adaptation de nez électroniques ou d'autres capteurs, à la détection des COV des racines dégradées pourrait être un moyen d'agir en préventif. La détection de COV indicateurs de dégradations permettrait d'identifier les silos à risque, et leur enlèvement pourrait alors être programmé rapidement de façon à limiter les pertes en sucre et les problèmes en sucrerie.

Les COV identifiés dans ce chapitre ont été sélectionnés suite au résultat de l'analyse statistique, mais également en fonction de leurs proportions. En effet, la méthode utilisée est non-quantitative et des données relatives ont été traitées. Les quantités en question sont

probablement de l'ordre de la ppm, et si un moyen de mesure doit être adapté, il est préférable que les COV cibles soient les COV indicateurs de dégradations présents dans les proportions les plus fortes, afin de faciliter l'aspect pratique.

Ces premiers résultats sont encourageants mais demandent à être confirmés. En effet, les analyses ont été effectuées sur des râpures de racines, il serait judicieux de réaliser ces tests sur des racines entières. De plus, la technique HS-SPME est performante, mais comme toute méthode, elle a ses limites. Ici, les COV les plus volatils et ayant le plus d'affinité pour la fibre adsorbante sont analysés. L'hypothèse que d'autres COV soient émis par les racines de betteraves n'est pas à exclure, et une analyse quantitative permettrait d'identifier les quantités en question.

Chapitre 4 : Travaux initiés

D'autres projets, complémentaires à ceux rapportés, ont été initiés dans le cadre de la thèse. Pour rester dans le domaine des projets nouveaux, l'analyse de l'activité enzymatique des racines a été initiée dans le cadre de l'essai conservation/variétés. En effet, par la recherche bibliographique, les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation du saccharose ont été identifiées. Dans le but de comprendre les mécanismes de dégradation du saccharose au cours du stockage et les différences variétales, l'étude de la SS, de la SPS et des invertases acides paraissait pertinente.

Pour rejoindre une partie du travail de la thèse partenaire, des analyses microbiologiques ont été prévues, également dans le cadre de l'essai conservation/variétés. L'idée ici était de quantifier et d'identifier les micro-organismes présents au cours du stockage. Comme mentionné précédemment, l'identification des pathogènes des racines pourrait être un atout majeur dans l'objectif des conservations de longue durée. En effet, des traitements adaptés, en silo ou en usine, limiteraient les pertes en sucre ainsi que les problèmes en usine.

Toujours dans l'objectif de proposer de nouvelles solutions, mais également d'agir en faveur du développement durable, des produits inducteurs de la résistance systémique des racines, et des apports en minéraux ont été testés. Appliqués au champ sur les feuilles de betteraves, leur efficacité a été évaluée suite à une période de stockage.

J'ai réalisé l'échantillonnage et le traitement des données de ces analyses. J'ai effectué les analyses métaboliques et j'ai pris l'initiative du projet de biocontrôle.

1) Activités enzymatiques

L'intérêt ici est d'approfondir les connaissances sur le métabolisme des racines. La mesure de l'activité de quatre enzymes : la SS, la SPS et les invertases neutre et acide, permettrait de comprendre les mécanismes métaboliques de la dégradation du saccharose au cours du stockage, et d'en savoir plus sur les facteurs influençant l'activité de chacune de ces enzymes. Les analyses ont été effectuées grâce à un partenariat entre le sélectionneur de l'essai conservation/variétés et un laboratoire extérieur. Un professeur a encadré le travail de laboratoire, et une doctorante, de par son expérience sur les feuilles de betteraves, a été d'une aide précieuse.

a. Matériels et méthodes

i. Échantillonnage

L'échantillonnage a été effectué pour l'année 1 uniquement. À raison de 3 répétitions, 5 variétés, 5 dates, 2 sites et 2 modalités de stockage, 300 échantillons étaient à disposition.

L'échantillonnage a été effectué en même temps que l'échantillonnage pour les analyses microbiologiques, immédiatement après la sortie des sacs des stockages en silo et en chambre.

Une première étape de stérilisation du plan de travail ainsi que des couteaux avec de l'alcool à 90° a été prévue. 8 racines/ sac ont été sélectionnées pour l'échantillonnage. Un nettoyage par broissage a été effectué afin d'éliminer le maximum de terre. Pour la découpe, c'est une tranche latérale, sous le collet, qui est prélevée, d'environ 0,5 cm d'épaisseur pour chacune des 8 racines. Cette tranche est ensuite redécoupée en son milieu (lamelle de 0,5 cm de large). 5 à 6 blocs d'environ 0,3 cm de long pour chacune des 8 lamelles sont découpés de part et d'autre du cœur de la lamelle, et disposés dans un tube Fison, dont le bouchon a été préalablement troué. Le tube est ensuite immédiatement plongé dans de l'azote liquide, et une fois l'échantillonnage effectué, les tubes sont transportés en carboglace pour un stockage à -80°C.

En laboratoire, la première étape a été de réduire en poudre les blocs de racines. C'est dans le laboratoire du sélectionneur partenaire que cette étape a été réalisée. Pour ce faire, le matériel et les échantillons étaient constamment plongés dans l'azote liquide. Le broyage a été effectué avec un vibro-broyeur à billes (TissueLyser II de Qiagen). Les blocs de racines congelés sont disposés dans les cylindres hermétiques avec couvercle à vis (10 mL chacun), et une bille en acier est disposée avant fermeture. Par vibration sur un plan horizontal, la bille frappe avec énergie les blocs de racine, les cellules sont alors désintégrées et l'échantillon est broyé. Dix secondes suffisent pour l'obtention d'une poudre homogène. Celle-ci est ensuite collectée avec une spatule préalablement plongée dans l'azote liquide, et disposée dans des fioles à scintillation, également préalablement plongées à -80°C. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C.

Une fois réceptionnés dans le laboratoire extérieur pour l'analyse des activités métaboliques, les échantillons ont été préparés sous la forme d'aliquotes. Muni d'un bac rempli d'azote liquide, les échantillons, ainsi qu'une plaque de 96 puits et des micro-tubes, sont maintenus congelés lors de l'aliquotage. Le micro-tube congelé est transféré sur une balance de précision, où un bloc de polystyrène troué réceptionne le tube. Une fois la tare effectuée, 20 mg +/- 3 mg de l'échantillon de poudre sont pesés et rapidement transférés sur la plaque. Une grille de notation permet d'identifier l'emplacement et le poids de chacun des échantillons (voir l'[annexe n°30a](#)).

ii. Analyses

Pour les tests d'activités enzymatiques, un dessalage a été pratiqué. Des plaques GE Healthcare ont été utilisées et préparées suivant le protocole du fournisseur.

L'extraction des protéines est initiée par l'ajout d'une pincée de PVPP pour protéger les enzymes de l'inactivation et de la précipitation par les phénols. Ensuite, le tampon d'extraction préparé avec du DTT (agent réducteur) à 0,5 M est ajouté à l'aliquote (échantillon).

Du sorbitol (200 mM) est ajouté pour l'extraction des InvA des parois (voir l'[annexe n°30b](#)).

Le mélange est rapidement placé sur un vortex pour agitation, puis centrifugé à 6000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est ensuite récupéré pour l'étape de dessalage (sauf pour les invertases des parois cellulaires, où le précipité est utilisé).

Les plaques GE Healthcare sont centrifugées à 2750 rpm pendant 1 min pour l'élimination de la solution de stockage (éthanol à 20 %). 300 µL de tampon d'extraction sont utilisés pour laver les puits (5 passages, centrifugation à 2750 rpm pendant 1 min). 100 µL de surnageant sont finalement placés dans les plaques pour dessalage (2 passages, centrifugation à 2750 rpm pendant 2 min ; voir [annexe n°30c](#)).

Les activités enzymatiques ont été testées en utilisant une plateforme robotisée [Gibon et al., 2004]. Les plaques ont été préalablement remplies avec les extraits de racines et les standards (standards de tomates et de feuilles de betteraves, testés par la doctorante du laboratoire partenaire). Une fois les extraits dilués aux concentrations programmées, les milieux réactionnels ont été ajoutés (voir [les annexes n°30d, 30e, 30f et 30g](#)).

Au préalable, les concentrations en hexoses et saccharose ont été évaluées et estimées non préjudiciables pour les mesures d'activités enzymatiques.

Pour la SPS et la SS, les mesures d'activités reposent sur le dosage du NAD⁺. La SPS (et la SS, également dotée de l'activité de synthèse du saccharose) lie le F6P et l'UDP-G en S6P avec libération de l'UDP. Par ajout d'une pyruvate kinase (PK), l'UDP est transformé en UTP avec production de pyruvate. Par ajout de la lactate déshydrogénase (LDH) et de NADH, le pyruvate est transformé en lactate, et du NAD⁺ est formé (voir l'équation 18). La concentration de ce dernier est dosée par colorimétrie, avec une lecture d'absorbance à 340 nm.



Pour les invertases, les mesures d'activités reposent sur le dosage du NADPH. Les Inv hydrolysent le saccharose en glucose et fructose. L'ajout de l'hexokinase (HK) au milieu phosphoryle les hexoses. L'ajout de la GPI isomérisse les F6P en G6P, et l'ajout de la G6PDH hydrogénise le NADP⁺ (voir l'équation 19).



b. Résultats

Les échantillons de racines de betteraves n'ont pas d'activité enzymatique (voir la figure n°111 ci-après).

Un test sans dessalage a été réalisé pour l'InvN (facilement détectée sur feuilles de betteraves), sans succès.

L'ajout d'UDP-G au milieu entraîne la mesure d'une activité SS : il y a réaction. Les enzymes seraient donc extraites, mais le milieu réactionnel ne serait pas optimal (substrats non disponibles, par exemple).

Un contrôle positif a été réalisé sur feuilles de betteraves (activité détectée par la doctorante du laboratoire partenaire). L'activité de l'InvN sur feuilles est détectée au bout de 30 min (voir la figure n°111).

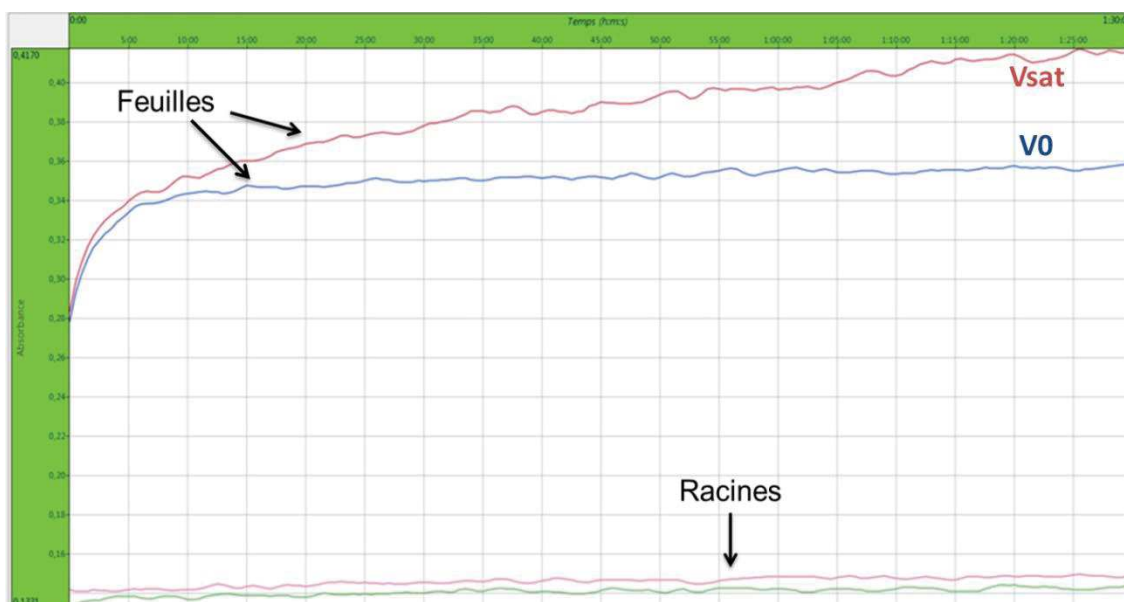


Figure n°111 : Activité de l'InvN chez la feuille et la racine de betterave.

c. Conclusion et perspectives

L'analyse de l'activité des enzymes des racines s'avère être plus subtile que dans les feuilles. Les protocoles doivent être adaptés et un travail à temps complet sur ces analyses doit être dédié.

L'étude de l'effet de la durée de stockage sur l'activité des enzymes de dégradation du saccharose permettrait d'approfondir les connaissances sur le métabolisme des racines. Quelques articles rapportent les changements métaboliques subis par les racines au cours du stockage. L'augmentation des activités des enzymes sucrolytiques en fonction de la température et de la durée de stockage serait responsable d'une partie des pertes en saccharose et de la production d'hexoses [Klotz and Finger, 2003].

Comme il a été vu dans les chapitres précédents, l'agressivité de l'arrachage contribue à augmenter les pertes de saccharose au cours du stockage. En faisant le lien avec des analyses métaboliques, les enzymes responsables de cette dégradation accentuée pourraient être identifiées. Certains articles mettent en valeur l'induction des invertases vacuolaires à la suite de blessures de récolte [Rosenkranz et al., 2001]. La recherche d'inhibiteurs ou de facteurs limitant l'activité de ces enzymes pourrait être une piste dans la recherche de solutions pour limiter les pertes en saccharose au cours du stockage [Pressey, 1968].

Certaines différences variétales pourraient s'expliquer par des différences d'activité métabolique. L'étude du facteur variété dans le cadre de ces analyses permettrait notamment d'identifier les métabolites responsables de la production d'hexoses, différant d'une variété à l'autre.

En plus d'approfondir les connaissances sur le métabolisme des racines au cours du stockage, les analyses métaboliques pourraient conduire à d'autres pistes innovantes pour limiter les pertes en saccharose au cours du stockage.

2) Analyses microbiologiques

Réalisées par le partenaire sélectionneur, les analyses microbiologiques se limitaient initialement à la quantification bactérienne. L'identification des micro-organismes, champignons et levures a également été réalisée (partenariat avec un laboratoire extérieur). Les données relatives à l'identification sont disponibles, mais n'ont pas été traitées dans le cadre de la thèse.

Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de coupes intérieures et extérieures de racines. L'objectif est ici de déterminer les différences de population microbienne entre le cœur des racines et l'épiderme ; entre les variétés ; entre un arrachage mécanique et manuel ; et entre les différents points de prélèvement (en fonction du cumul de °j int.).

a. Matériels et méthodes

i. Échantillonnage

L'échantillonnage a été effectué pour chaque sortie de silo (et de chambre en année 1) sur chaque répétition de chacune des variétés. Soit 30 sacs par date et par site en année 1 (5 variétés* 3 répétitions*2 arrachages) ; et sur 18 sacs en année 2 (3 variétés* 3 répétitions* 2 arrachages).

Une première étape de stérilisation du plan de travail ainsi que des couteaux avec de l'alcool à 90° a été prévue. Les tubes Fison sont pesés à vide et la balance tarée (précision au mg). 8 racines/sac sont sélectionnées pour l'échantillonnage. Un nettoyage par brossage a été effectué afin d'éliminer le maximum de terre. Pour la découpe, c'est une tranche latérale sous le collet qui est prélevée, d'environ 0,5 cm d'épaisseur pour chacune des 8 racines. Cette tranche est ensuite redécoupée en son milieu (lamelle de 0,5 cm de large).

Pour les coupes extérieures et intérieures, de fines tranches sont découpées. Le poids final était de 2,5 g. Les tranches extérieures ont été prélevées au niveau de l'épiderme ; les tranches intérieures à la périphérie du cœur des racines.

Une fois le poids final atteint, les tubes sont immédiatement placés en carboglace pour un stockage ultérieur à -80°C.

ii. Analyses

C'est par la méthode q-PCR que les organismes ont été quantifiés. Elle consiste à suivre en temps réel l'amplification des fragments d'ADN cibles (bactériens en année 1).

L'extraction d'ADN a été effectuée à partir de 100 mg de poids sec obtenu par lyophilisation des échantillons frais. Les tubes ont été laissés ouverts avec un film micro-perforé à -80°C durant une nuit. Ils sont ensuite passés au lyophilisateur durant 48 h (Instrument Delta 1-24 LSC de chez Christ ; étagère à 10 °C, 1980 mbar ; température de condensation : -58 °C et température de décongélation : -26 °C). Ils sont ensuite broyés en poudre avec un agitateur et une bille métallique incorporée dans le tube Fison.

Le kit Dneasy Plant Maxi Kit (Qiagen) a été utilisé. Les extraits ont été normalisés à 1 ng/μL d'ADN total grâce aux mesures par nanodrop.

La réaction d'amplification a été réalisée avec la technologie SYBRGreen (avec une ADN-polymérase). Les amorces universelles bactériennes du QuickScan Total Count Bacteria Kit de chez Ribotechnologie ont été utilisées (16S Rrna gene). 1 μL d'échantillon testé a été utilisé pour un volume final de 25 μL. Le contrôle positif a été assuré par des clones standards d'*Escherichia coli*. Deux mesures par échantillons ont été réalisées.

Les données traitées sont basées sur le résultat de l'amplification des fragments d'ADN, exprimées en nombre de copies moyen par μL (voir l'équation 20).

$$20) \text{ Amplification (nb copies moyen}/\mu\text{L}) = \left(\frac{C}{X}\right) * 0,912.10^{12}$$

Où :

- C : concentration d'ADN mesurée (ng/μL), dans notre cas : 1 ng/μL
- X : longueur du fragment amplifié (pb/copies), dans notre cas : 1505 pb/copie
- $0,912.10^{12} \leftrightarrow \frac{1}{\text{Poids d'une paire de base } \left(\frac{\text{ng}}{\text{pb}}\right)}$, et 1 pb = $1,096.10^{-12}$ ng

L'analyse statistique a été réalisée de la même façon que celle mentionnée dans le M&M du chapitre 2. Seuls les résultats pour le stockage en silo de l'année 1 ont été traités ici.

Les variables explicatives sont le lieu, le type d'arrachage (uniquement en fin de stockage), la durée de stockage et la variété.

Les variables à expliquer sont le nombre de copies moyen d'ADN bactérien / 100 mg de poids frais pour les échantillons des prélèvements de l'épiderme des racines (extérieur), et de l'intérieur des racines.

b. Résultats et discussions

Les résultats de qPCR pour la population bactérienne de l'année 1, stockage silo, sont traités dans ce mémoire.

i. Échantillons de l'épiderme

Une tendance à la diminution de la population bactérienne est observée au cours du stockage sur le site de Lillers avec un arrachage mécanique (en moyenne, 1,7 fois moins de bactéries en fin de stockage comparé à J0).

Cette observation pourrait s'expliquer par la compétitivité avec les champignons et les levures. Au cours du stockage et en présence de blessures, la croissance de ces derniers serait favorisée au détriment de celle des bactéries. Les champignons et les levures consommeraient alors la majeure partie des ressources disponibles, conduisant à la diminution de la population bactérienne.

En observant le comportement des variétés, V3, caractérisée comme variété la plus riche (voir le tableau n°4), avec un IP intermédiaire (voir les résultats du chapitre 2), possède une population bactérienne plus dense que celle de V1, variété la plus sensible à la pourriture (voir la figure n°112).

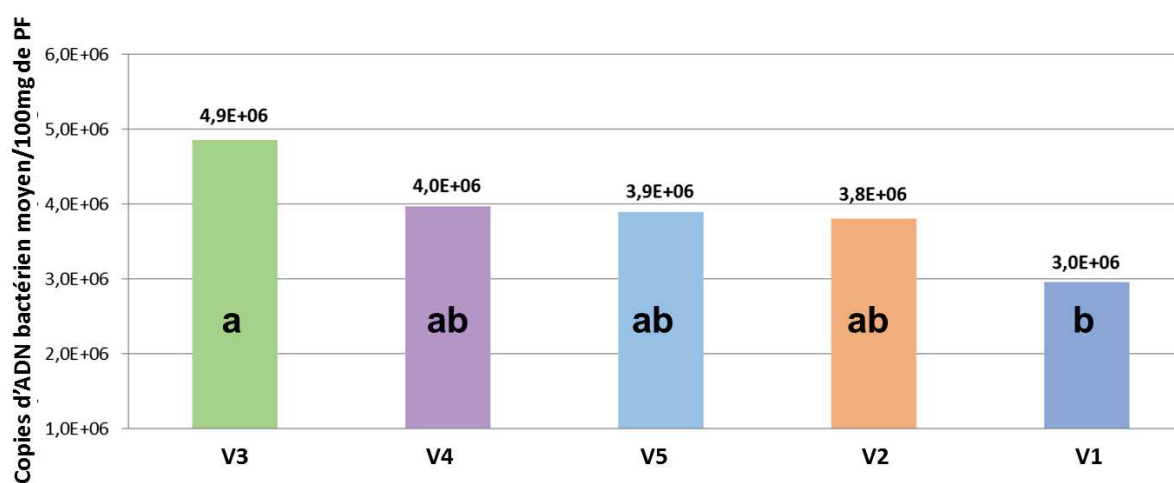


Figure n°112 : Moyenne de la population bactérienne au cours du stockage sur l'épiderme des racines – Essai conservation/variétés - Année 1 – Site de Lillers – Arrachage mécanique.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Ce résultat souligne l'intérêt d'une quantification des champignons et levures, où une évolution inverse de celle des bactéries serait attendue ici, avec une présence accentuée pour V1. L'attraction des bactéries par les concentrations en saccharose élevées pourrait expliquer leur présence accentuée sur V3. L'identification des populations aiderait à expliquer ce phénomène.

En fin de stockage, la population bactérienne serait favorisée sur l'épiderme des racines avec un arrachage manuel (voir la figure n°113).

Cette observation conforte l'hypothèse initiale suggérant que les champignons et levures seraient responsables du développement de pourriture au cours du stockage, avec un arrachage mécanique. Ceux-ci seraient prédominants sur l'épiderme des racines, diminuant ainsi la population de bactéries en fin de stockage avec un arrachage mécanique.

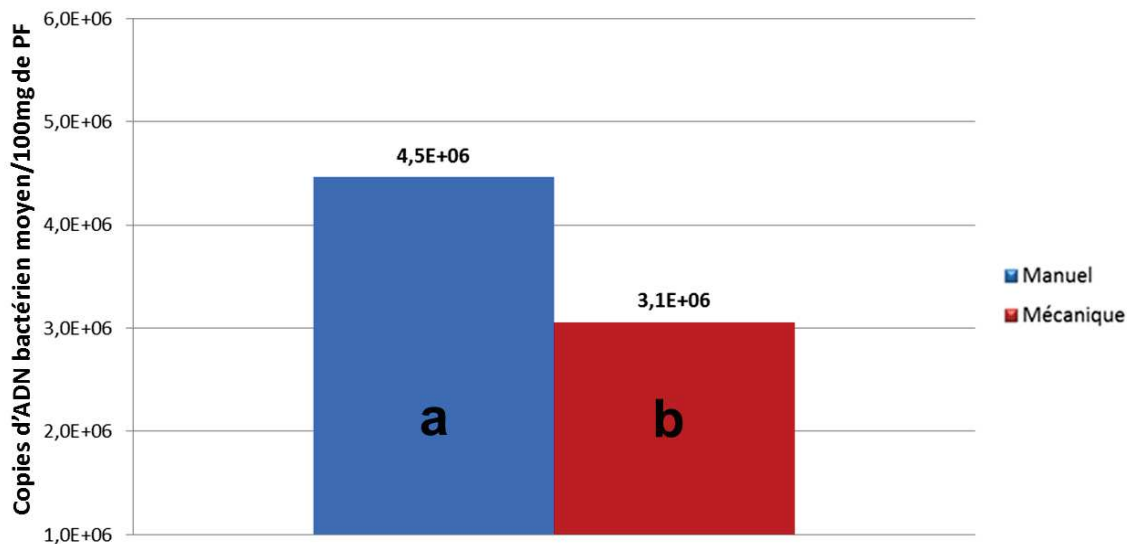


Figure n°113 : Moyenne de la population bactérienne en fin de stockage sur l'épiderme des racines en fonction de l'arrachage – Essai conservation/variétés - Année 1 – Site de Lillers.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

Suite aux tests statistiques, le facteur lieu est identifié comme le facteur prédominant pour un stockage en silo (28 %). Une population bactérienne plus importante sur les racines du site de Lillers que sur celles du site d'Origny est observée (population presque deux fois plus importante sur le site de Lillers comparé au site d'Origny).

En se référant à l'IP de l'année 1, il est observé que le développement de pourriture est plus important sur Lillers que sur Origny. Les bactéries pourraient initier le développement de la pourriture et les autres micro-organismes profiteraient alors de cette première contamination pour s'introduire dans les racines.

Les facteurs durée et variété sont responsables du reste de la variabilité des mesures (respectivement 13 % et 9 %).

50 % d'inconnus sont évalués ici. Les méthodes d'échantillonnage et d'analyse ont été améliorées en année 2.

Des effets variété et durée sont mesurés sur le site de Lillers (respectivement 24 % et 22 %).

Le facteur arrachage est responsable de la majeure partie de la variabilité des résultats de Lillers en fin de stockage (62 %). L'importance du facteur arrachage en fin de stockage est de nouveau mise en évidence. Comparé à un arrachage manuel, l'arrachage mécanique engendre des blessures représentant des portes d'entrée pour les pathogènes. Au cours du stockage, les

micro-organismes se développent plus facilement lorsque les tissus externes sont endommagés, et ici, en fin de stockage, les bactéries seraient alors plus facilement remplacées par une autre population microbienne à l'origine de la pourriture, avec un arrachage mécanique.

Il n'a pas été détecté de facteur à effet significatif sur le site d'Origny. Il semblerait qu'il n'y ait pas de différences significatives entre les quantités de bactéries présentes chez les différentes variétés aux différents points de prélèvement.

ii. Échantillons de la partie interne des racines

Seul l'effet lieu apparaît significatif pour les échantillons de la partie intérieure des racines (38 %). La population bactérienne a tendance à être plus importante dans les racines du site de Lillers que dans celles du site d'Origny, comme pour les échantillons de l'épiderme.

Le reste de la variabilité n'est pas identifié avec les facteurs évalués. L'inconnue mesurée peut s'expliquer par une méthode d'échantillonnage non-adaptée, ou encore une technique d'analyse non-optimale.

En fin de stockage, l'effet arrachage est significatif sur le site de Lillers (responsable de 34 % de la variabilité). À l'opposé des résultats du site de Lillers sur les épidermes des racines, pour les échantillons internes c'est avec un arrachage mécanique que la population bactérienne est la plus dense (en moyenne 1,5 fois plus élevée que l'arrachage manuel ; voir la figure n°114).

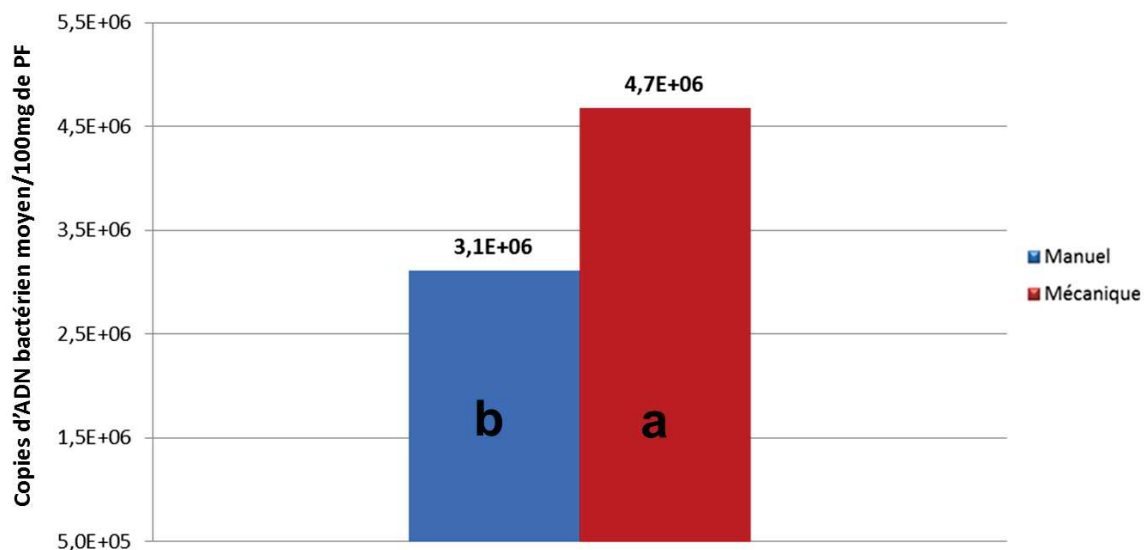


Figure n°114 : Moyenne de la population bactérienne en fin de stockage au cœur des racines en fonction de l'arrachage – Essai conservation/variétés - Année 1 – Site de Lillers.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

L'hypothèse à avancer ici serait une migration des bactéries de l'épiderme vers l'intérieur des racines, favorisée par les blessures de la récolte mécanique. Les champignons et levures resteraient alors en surface des racines et seraient alors responsables de la pourriture externe

des racines ; alors que les bactéries seraient à l'origine d'une pourriture plus profonde, caractérisée par un aspect gluant et gélatineux (racine translucide et gluante).

c. Conclusion et perspectives

Dans ce travail, seule une partie de la population microbienne est observée (bactérienne). Il n'y a pas d'information sur la nature des bactéries, ni sur leur activité (vivantes ou mortes), et une part d'inconnue importante dans l'explication de la variabilité des résultats est décelée dans l'analyse statistique.

Un travail à temps complet devrait être dédié aux résultats de ces analyses microbiologiques afin d'aboutir à une interprétation solide des résultats. Ici, seules des hypothèses sont émises.

L'identification des pathogènes néfastes au stockage des racines pourrait être un outil stratégique dans le contrôle du développement des pourritures au cours du stockage. Elle permettrait également d'appréhender les problèmes en usine et de conduire à des actions préventives adaptées.

L'étude des relations de compétition entre espèces permettrait d'identifier les organismes les plus virulents et néfastes à la conservation des racines. Des analyses qPCR sur l'ADN des levures et champignons seraient une future piste à envisager.

L'étude de l'interaction des racines avec la flore du sol permettrait de faire le lien avec l'effet lieu, et peut-être d'en savoir plus sur les différences variétales.

3) Induction de mécanismes de défenses chez la betterave sucrière

En raison de convictions personnelles et dans le cadre de l'investissement de Tereos dans le développement durable, le test de produits à base de bactéries et de minéraux a été prévu dans le cadre de la thèse. En effet, renforcer les défenses des racines en amont d'un stress (biotique ou abiotique) avec des produits d'origine naturelle est une stratégie intéressante à exploiter afin de limiter les pertes en sucre au cours du stockage, et d'agir en faveur de la RSE.

Différents traitements foliaires ont été testés.

Un traitement à base de bactéries (Serenade, *Bacillus subtilis*), à base de minéraux (Siliforce, INCA, et du chlorure de potassium), et finalement un produit synthétique aux propriétés voisines d'un produit de biocontrôle homologué aux États-Unis (BION 50WG, analogue de l'acide salicylique).

Les produits à base de minéraux augmenteraient la résistance physique des racines face aux maladies et stimuleraient le stockage du saccharose dans les vacuoles des cellules. Les autres produits induiraient la résistance systémique de la plante (cf. chapitre 1.e).

Dans cet essai, l'intérêt est porté en particulier sur la résistance face aux maladies. L'efficacité des produits a été évaluée en comparant les taux de pourriture des racines traitées à ceux d'un lot témoin après une période de stockage.

a. Matériels et Méthodes

i. Caractéristiques des produits

Un produit à base de bactéries : Serenade max, de la société Bayer, a été testé. Ce sont des bactéries naturelles : *Bacillus subtilis* (BacB), qui induiraient la résistance systémique des plantes par la production d'enzymes de dégradation des parois externes des champignons et par la synthèse d'antibiotiques [Asaka and Shoda, 1996 ; Collins and Jacobsen, 2003 ; Collins et al., 2003 ; et voir la fiche technique en [annexe n°31](#)].

Un second produit à base de bactérie était ciblé.

Il s'agissait de *Bacillus mycoides* isolate Bac J (BmJ), bactéries non-pathogènes contre la cercosporiose de la betterave sucrière (*Cercospora beticola* Sacc.), aussi appelée « Cercospora Leaf Spot » (CLS) [Bargabus, 2003 ; Bargabus et al., 2002]. Les BmJ, naturellement présentes sur les feuilles de la betterave, joueraient le rôle d'activateur des défenses naturelles et offriraient alors une protection biologique contre de nombreuses maladies sur du long terme [Bargabus et al, 2002].

En raison de complications juridiques, le produit de biocontrôle BmJ n'était pas disponible et c'est un produit de synthèse : le BION 50 WG, qui a été testé, avec pour principe actif l'acibenzolar-S-méthyl. En effet, l'application de BmJ sur les feuilles de betteraves est comparée à celle du produit Actigard (désormais BION 50 WG), commercialisé par Syngenta et reconnu comme inducteur des défenses naturelles des plantes [Görlach et al., 1996 ; Lawton et al., 1996 ; Srinivas and Danielson, 2001]. L'application de BmJ offrirait une protection équivalente à celle apportée par le BION 50 WG, avec une réduction de 70 % des symptômes de CLS sur la betterave [Bargabus, 2003 ; Bargabus et al., 2002 ; Bargabus and Jacobsen, 2007]. Ce résultat est validé suite à des essais menés aussi bien au laboratoire qu'au champ [Bargabus et al., 2002].

Le BION 50 WG induirait la résistance systémique acquise de la betterave sucrière ; il est donc supposé activer les défenses dans la plante entière, donc, dans la racine également (voir la fiche technique en [annexe n°32](#)). Il produirait un stress oxydant à l'origine de la synthèse de molécules toxiques pour les pathogènes, et activerait la lignification des parois cellulaires de la plante (action de peroxydases). Il activerait également des enzymes de dégradation des parois des champignons (chitinases et glucanases), sans apparition de nécroses, ni d'autres dégradations physiologiques de la betterave [Bargabus et al., 2002].

La stratégie consiste ici à stimuler les défenses naturelles de la betterave en amont d'une attaque de pathogènes, sans porter préjudice au rendement en saccharose de la plante. Il s'agit d'agir en préventif sur du long terme en armant la plante contre ses potentiels ennemis.

Concernant les produits à base de minéraux, le Siliforce d'AgroSolutions semblait intéressant à tester. Dans la nature, le silicium est présent sous forme de silice (SiO_2 50 à 400 g/kg de terre) mais est assimilé par les plantes sous forme d'acide silicique (Si(OH)_4) ou de silicate ($\text{Si(OH)}_3\text{O}^-$). De par sa formulation, Siliforce favorise l'absorption de silicium, minéral procurant des propriétés de résistance physique avec l'épaississement des structures cellulaires et de stimulation des défenses naturelles par l'activation de chitinases et

peroxydases [Curry and Perry, 2007 ; Ma, 2004 ; Ma and Miyake, 2001 ; Ma and Yamaji, 2006 ; voir le travail de recherche en [annexe n°33](#) et la fiche technique en [annexe n°34](#)].

Suite à des échanges en interne, il semblait intéressant de tester également les bénéfices d'apports en macro et oligoéléments. Le produit INCA de Gowan a ainsi été ajouté au plan d'expérimentation. Il renforce les apports en calcium et en zinc des plantes, essentiels pour leur structure et leur développement [Broadley et al., 2007 ; White and Broadley, 2003 ; voir la demande d'extension d'usage en [annexe n°35](#)].

Et pour finir, un apport de chlorure de potassium a également été testé. Lors des assemblées générales de Tereos, de nombreux planteurs interpellaient le service agronomique au sujet des propriétés bénéfiques d'un tel apport sur la conservation des pommes de terre. Comme vu dans l'état de l'art (chapitre 1.d.iv et [annexe n°18](#)), le potassium pourrait stimuler le stockage du saccharose dans les vacuoles et augmenter alors la productivité des parcelles.

Le renforcement du système immunitaire des racines et de leur structure avant la récolte favoriserait la résistance des racines face aux maladies au cours du stockage. Les résultats attendus à la suite de la période de stockage seraient des taux de pourriture plus faibles que ceux des racines non traitées (témoin).

ii. Échantillonnage

Les parcelles qui ont fait l'objet des traitements foliaires étaient situées à Malzy (dans l'Aisne, à environ 21 km de l'usine d'Origny-Sainte-Benoite). Une parcelle correspond à un traitement (55.5 m²/parcelle).

Les applications des produits ont été effectuées selon les recommandations des fournisseurs, tout en considérant les propriétés des produits.

Le BION 50WG, supposé activer les défenses des racines, a été appliqué tardivement (24/08/2016) pour une efficacité maximale le jour de la récolte et de la confection du silo. En effet, avant que les blessures ne cicatrisent, le risque de contaminations est maximal les premiers jours suivant la récolte. Il semblait donc judicieux de cibler l'application de ce produit en fin de développement de la plante, environ un mois avant la récolte.

Pour les produits à base de minéraux, ils ont été appliqués pendant le développement de la plante ; il en a été de même pour le produit à base de bactéries (voir le tableau n°7).

La récolte a eu lieu le 13/10/2016. Six sacs de 25 racines/parcelle ont été confectionnés et stockés dans le silo conservation/variétés d'Origny (48 sacs au total, car 5 traitements et une parcelle témoin, non-traitée).

La sortie des sacs a été effectuée à un cumul d'environ 575°j int (17/01/2017).

iii. Analyses

L'évaluation du taux de pourriture a été faite de la même façon que celle mentionnée dans le M&M du chapitre 2, à l'exception du nombre de racines découpées. Ici, la totalité des racines des sacs a été utilisée pour l'épluchage.

L'analyse statistique a été réalisée de la même façon que celle mentionnée dans le M&M du chapitre 2.

Les variables explicatives sont les différents traitements. La variable à expliquer est le taux de pourriture.

Applications	Printemps				Automne		Nb d'applications total	Dose totale kg, g ou L/ha
	07/04/2016	24/05/16	01/06/16	23/06/16	24/08/16	21/09/16		
Inca P		X	X	X			3	3 L/ha
Inca P + A		X	X	X	X	X	5	5 L/ha
Silliforce P		X	X	X			3	1,5 L/ha
Bacillus P		X	X	X			3	3 L/ha
Bacillus P + A		X	X	X	X	X	5	5 L/ha
Bion					X	X	2	0,1 g/ha
Chlorure de potassium	X						1	555 kg/ha

Tableau n°7 : Récapitulatif des traitements.

P ↔ Printemps .

A ↔ Automne.

b. Résultats

Les tests statistiques révèlent qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux de pourriture des racines des différents traitements (voir la figure n°115).

Comparé au lot de racines non-traité, les produits testés ne semblent pas limiter le développement de pourriture de façon significative.

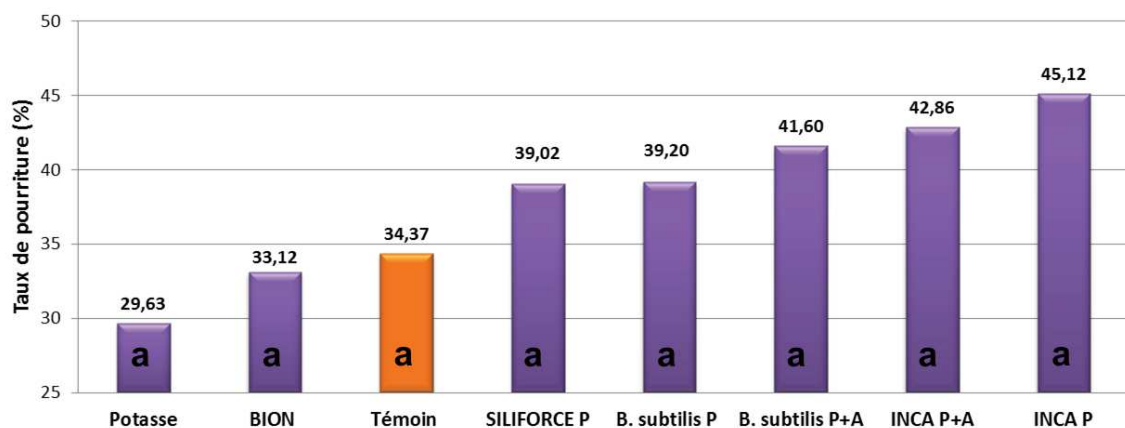


Figure n°115 : Taux de pourriture en fonction du traitement en fin de stockage (environ 575°j int).

P ↔ Printemps.

A ↔ Automne.

Les points assignés de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Tukey.

c. Conclusion et perspectives

Même si ces résultats ne mettent pas en valeur l'efficacité des produits de biocontrôle, le renouvellement de ce type d'essai permettrait d'approfondir les connaissances en interne, d'apporter de la robustesse aux premiers résultats, voire d'optimiser l'utilisation et l'évaluation de l'efficacité des produits (périodes et conditions d'application, doses, mesures finales, ...).

Dans cet essai, par exemple, le stockage des sacs en silo a certainement été d'une durée trop importante (3 mois), même en étant dans l'optique des campagnes de longues durées. Cet essai pourrait être renouvelé avec un stockage de 2 mois.

Dans l'optique d'améliorer la conservation des racines en silo tout en respectant l'environnement et en faisant preuve d'innovation, le recours à des interactions biotiques et l'utilisation de produits naturels est une piste à envisager.

Il existe, par exemple, une symbiose naturelle entre *Pseudomonas fluorescens* et *Beta vulgaris* au niveau de la rhizosphère. *P. fluorescens* est une bactérie bénéfique pour le sol et la plante, avec ses capacités de dénitrification et de production d'antibiotiques. *P. fluorescens* produit des métabolites secondaires, la viscosinamide et le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), et une enzyme de dégradation de la paroi externe des champignons, une endochitinase. Grâce aux antibiotiques et à l'enzyme de dégradation, *P. fluorescens* assure une protection de l'état sanitaire de la betterave en luttant contre l'invasion de différentes espèces fongiques telles que *R. solani* et *P. ultimum* [Nielsen et al., 1998 ; Thrane et al., 2000].

L'étude des paramètres influençant favorablement la colonisation de la rhizosphère de la betterave par *P. fluorescens* permettrait d'exercer un contrôle biologique des racines et ainsi favoriser un état sanitaire sain des racines en entrée de silo. Mieux comprendre le mode d'action des composés inhibiteurs et de l'endochitinase produits par *P. fluorescens* pourrait amener à la création de nouveaux inhibiteurs des contaminations microbiologiques. Et l'investissement dans cette étude favoriserait le développement de la lutte biologique dans les parcelles gérées par Tereos et son engagement en faveur du développement durable.

D'autres recherches s'intéressent aux effets antifongiques des phytohormones. L'acide salicylique et l'acide jasmonique, deux phytohormones impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, ralentiraient la propagation des pourritures au cours du stockage et pallieraient les effets néfastes de certains stress abiotiques comme la déshydratation [Fugate et al., 2012, 2013]. Dans ces études, les phytohormones ont été administrées à différentes concentrations en solutions aqueuses sur un minimum de sept racines de betteraves de façon à submerger les racines. Les phytohormones n'empêchent pas la contamination par les champignons mais elles ralentissent leur propagation. Le taux de pourriture pour des silos d'une durée de stockage allant jusqu'à 50 jours pourrait alors être réduit. Les traitements sont efficaces contre *B. cinerea*, *P. claviforme* et *P. betae*.

L'application de phytohormones sur les silos de betteraves au cours de la période de stockage pourrait représenter une solution efficace de conservation et de protection contre la pourriture. L'étude de l'impact des phytohormones sur le métabolisme de la betterave pourrait améliorer

les connaissances sur les mécanismes de défense mis en place par la racine et permettre d'identifier des acteurs-clefs de la résistance systémique.

Les bactéries de biocontrôle BmJ pourraient être testées afin d'évaluer l'efficacité des souches bactériennes sur l'induction des défenses des racines.

Situées à la surface des feuilles de betteraves, ces bactéries sécrètent une molécule de signalisation (losange noir sur la figure n°116). Le signal pénètre passivement à travers la cuticule pour être perçu soit au niveau de la membrane plasmique, soit dans le cytosol des cellules par des récepteurs. La réception et l'interprétation du signal se traduisent par la production de l'anion superoxyde (O_2^-) par la NADPH oxydase suivie d'une production biphasique de peroxyde d'hydrogène. Deux classes d'enzymes sont également produites : chitinase et glucanase, et transportées dans la zone extracellulaire, l'apoplaste. L'application de BmJ ne conduit pas à la réaction d'hypersensibilité (pas de nécroses). Ce phénomène peut s'expliquer par la production d'antioxydants en réponse au stress oxydatif.

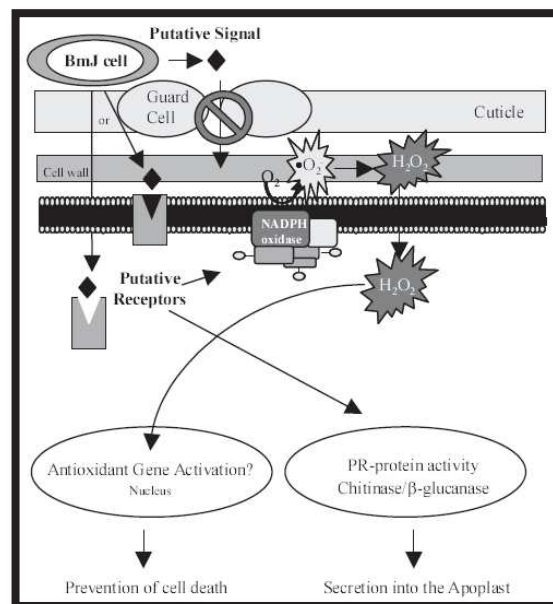


Figure n°116 : Interactions entre BmJ et la betterave sucrière - Stress oxydatif et induction des protéines de défense [Bargabus et al., 2002].

Le principe de la mycofumigation a également été testé sur les semences de betteraves sucrières dans le laboratoire du professeur B.J.Jacobsen. Il consiste en la fumigation dans le sol de composés organiques volatils produits par des champignons (en l'occurrence, *Muscador albus*, champignon endophyte du cannellier *Cinnamomum zeylanicum*) pour lutter contre les pathogènes des racines de betteraves. Ces COV auraient des propriétés antimicrobiennes contre *Aphanomyces cochlioides*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum* [Grimme, 2004]. Il s'agit principalement d'alcools (3-méthylbutan-1-ol, identifiés dans l'analyse COV sur râpures de racines), d'esters (comme l'acétate d'éthyle et de méthyle, identifiés dans l'analyse COV sur râpures de racines), de cétones, d'acides et de lipides. Le traitement semble efficace contre *P.ultimum*.

La méthode de la fumigation pourrait être testée dans des essais Tereos pour lutter contre les pathogènes intervenant au cours du stockage des racines.

L'intérêt des huiles essentielles dans la lutte biologique est connu [Dayan et al., 2009]. Avec l'ISA de Lille, un premier protocole expérimental a été proposé, sans aboutir en raison d'autres projets prioritaires (voir l'annexe n°36).

Suite à des échanges avec l'enseignant/chercheur Jérôme Muchembled, spécialisé en phytopathologie, cinq principes actifs ont été sélectionnés. La sélection a été faite sur la base de l'expertise de J. Muchembled, d'une recherche bibliographique, et en fonction des aspects pratiques et appliqués. La disponibilité des composés sous forme synthétique et leur efficacité antifongique sur d'autres tubercules ont été privilégiées (pommes de terre notamment).

Les principes actifs sélectionnés ont été la carvone, extraite de la menthe [Hartmans et al., 1995] ; le thymol, du thym [De Lira Mota et al., 2012] ; l'eugénol, du girofle [De Jesus Faria et al., 2006] ; le carvacrol, de l'origan ou du thym [Abbaszadeh et al., 2014] ; et le limonène, de l'écorce d'orange [Chee et al., 2009 ; Omran et al., 2011]. L'efficacité de ces principes actifs aurait pu être testée sur les pathogènes jugés les plus néfastes à la conservation, à savoir *B. cinerea*, *R. solani*, *F. oxysporum* et *L. mesenteroides*.

Le protocole pourrait être ajusté avec les résultats d'analyses microbiologiques obtenus dans le cadre de la thèse partenaire, et mis en œuvre dans l'optique d'identifier des inhibiteurs du développement de pourriture en silo. L'utilisation ultérieure d'huiles essentielles efficaces pourrait être la vaporisation sur silo.

Grâce à la cartographie microbiologique de la thèse partenaire, les principaux pathogènes qui se développent en silo au cours du stockage sont identifiés. Le test de différents principes actifs et de différentes méthodes d'application (foliaire, mycofumigation, vaporisation sur silo,...) sur les pathogènes identifiés pourrait être judicieux, et conduire à la proposition de solutions alternatives aux fongicides actuellement utilisés en champ.

Discussion générale et lien avec le procédé sucrier

La conservation des racines en silo dépend de facteurs physiologiques et environnementaux qui conditionnent la durée de stockage en silo pour laquelle la qualité industrielle sera maintenue.

La nature et la composition du sol, en interaction avec le génotype, définissent la composition physique et biochimique des racines à la récolte.

Un sol calcaire ou siliceux, par exemple, contribuera à la résistance physique de la MEC des racines en renforçant les propriétés gélifiantes des pectines par la formation de ponts calciques. La cohésion entre les fibres est alors augmentée. Comme mentionné au chapitre 1 dans l'état de l'art, la formation de ces ponts n'est possible qu'avec des acides galacturoniques non-méthylés. En fonction de l'activité pectine-méthylestérase de leurs cellules, les variétés sont plus ou moins disposées à la formation de ces ponts, et donc plus ou moins aptes à la formation d'une structure ferme.

Un sol riche en minéraux, en potassium notamment, assurera le développement foliaire de la plante et le stockage du saccharose dans les vacuoles des racines (voir l'annexe n°18). La richesse à la récolte est fonction de la variété (voir les figures n°58 et n°61). En fonction de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse et l'hydrolyse du saccharose (SPS, SS et AInv), les cellules des racines seront plus ou moins performantes dans le stockage du saccharose. L'organisation des tissus conducteurs jouerait également un rôle dans le stockage du saccharose. Le nombre de cercles de cambium varierait d'une variété à l'autre, influençant alors la proximité entre le phloème et les cellules de stockage, et donc la diffusion du saccharose [Doney et al., 1981].

L'agressivité de la récolte conditionne l'état sanitaire des racines, en interaction avec le génotype et la durée de stockage. Plus les blessures sont nombreuses et profondes, plus il est facile pour les micro-organismes de pénétrer dans les racines. Il a été vu qu'avec un arrachage manuel, les racines stockées jusqu'à plus de 500°j int ne présentent pas de développement de pourriture. L'évolution de la pourriture suit celle d'une croissance microbologique. Il semblerait que la pourriture soit initiée aux alentours de 250°j int (soit environ 1 mois de stockage en 2017 avec une récolte à la mi-octobre). Elle suit une croissance exponentielle jusqu'à environ 350°j int (une dizaine de jours de stockage supplémentaires en 2017) ; pour ralentir ensuite ; voire subir une seconde croissance exponentielle.

Avec les analyses microbiologiques initiées, la tendance de la population bactérienne a été décrite. Les premières contaminations pourraient être liées à des bactéries et seraient suivies par l'intrusion de pathogènes opportunistes, tels que *P.betae* et *B.cinerea*. Au cours du stockage, ces micro-organismes consomment les réserves de saccharose des racines et diminuent leur qualité industrielle par l'apparition de molécules indésirables comme les hexoses, le kestose, ou encore les dextranes.

Les contaminations libèrent également des COV, caractéristiques de la dégradation des racines. Les composés organiques constitutifs sont transformés au cours du stockage et convertis en esters, acides et alcools, principalement. Ces derniers dégagent des odeurs désagréables et pourraient être utilisés comme indicateurs de dégradation afin de détecter les silos fortement contaminés, et les évacuer rapidement pour limiter les pertes en saccharose et les problèmes en process.

L'ambiance du silo est également déterminante pour un stockage de longue durée.

Le stockage de racines malades amplifiera le phénomène de développement de pourriture. Une aération insuffisante conduira à une augmentation accentuée des températures. Une récolte en conditions pluvieuses enfermera de l'humidité dans le silo, avec un enrobage de terre autour des racines, favorable au développement des pathogènes.

Des systèmes de protections testés par Tereos ont prouvé leur efficacité face à la pluie, voire au gel. La ventilation des silos est un autre projet d'intérêt pour la conservation longue durée des racines et pourrait compléter les systèmes de protection déjà mis en place.

Des tests de silos ventilés sont mis en place depuis 2015 sur certains sites industriels de Tereos, mais le manque de connaissance à ce sujet est pénalisant pour la conduite des essais. Dans le cadre de la thèse, une recherche bibliographique a été initiée et un protocole proposé pour la potentielle gestion des systèmes de ventilation et l'évaluation de son efficacité, notamment dans l'objectif de diminuer les pertes en sucre (voir l'[annexe n°37](#)).

Comme il a été mentionné dans l'introduction, cette thèse en physiologie végétale a été conduite en collaboration avec une thèse industrielle. C. Meade (doctorante sur la partie procédé) et moi-même avons travaillé en équipe, de façon à lier les observations terrains aux problèmes d'usine et cibler les changements physiologiques au cours du stockage néfastes au fonctionnement du procédé et à l'extraction du saccharose.

Les différents indicateurs de contaminations mesurés dans les essais de stockage longue durée et mentionnés dans le chapitre 4, les hexoses et le kestose notamment, représentent des molécules nuisibles au procédé (voir la partie 2)a. du chapitre 1).

Pour évaluer l'évolution de la qualité industrielle au cours du stockage et son potentiel impact sur le procédé, c'est la technique de l'épuration standardisée qui a été utilisée sur les racines de l'essai conservation/variétés. Cette technique reproduit toutes les étapes de transformation des racines jusqu'à l'obtention d'un jus épuré à échelle de laboratoire. Grâce aux conditions optimales, elle met en évidence la qualité industrielle réelle des racines (voir le protocole en [annexe n°38](#)).

Plusieurs paramètres ont été mesurés, à savoir, le mannitol, les sels de chaux, la coloration, le pH et la vitesse de filtration (Fk). Le °Brix (mesure du taux de MS soluble) a également été mesuré, ainsi que les concentrations en acides organiques. Les résultats mentionnés ci-dessous sont consultables dans la thèse partenaire.

Le mannitol est un indicateur de contamination et serait corrélé aux dextrans (cf. la partie 2)a. du chapitre 1 ; voir le protocole d'analyse en [annexe n°39a](#)). Globalement, les résultats pour l'essai conservation/variétés sur les deux années indiquent que la concentration en mannitol augmenterait significativement en fin de stockage, et que V1 (variété la plus sensible à la pourriture) a une concentration significativement plus élevée que les deux autres variétés.

Au regard des mesures d'IP, la mesure de mannitol en procédé semble être pertinente pour le suivi des contaminations.

Les acides organiques sont également indicateurs de contamination (voir le protocole d'analyse en [annexe n°39b](#)). Notamment l'acide lactique pour lequel la concentration en fin de stockage est significativement plus élevée que les autres points de prélèvement, et significativement plus élevée pour V1 comparée aux deux autres variétés. L'acide lactique serait corrélé au mannitol ($R^2 = 0,6$). En effet, suite à l'hydrolyse du saccharose par la dextrane saccharase (provenant de *L. mesenteroides*), les unités de glucose polymérisent pour former les dextrans, et de l'acide lactique est libéré.

La mesure des sels de chaux pourrait être un indicateur du taux d'impuretés présent dans les racines, et serait corrélé aux ions calcium et magnésium présents dans le sol. Plus la quantité de ces ions est importante et plus il y a d'impuretés, plus les ions calcium vont réagir et former des agrégats, soit des sels de chaux (voir le protocole d'analyse en [annexe n°39c](#)). Globalement, un effet lieu est mesuré (sels de chaux présents en quantité plus importante sur le site de Lillers en année 2), et une hausse des sels de chaux est observée en fin de stockage. La concentration est significativement plus importante pour V1 comparée aux deux autres variétés en fin de stockage. Là encore, la correspondance avec la qualité agronomique est retrouvée : l'IP et la concentration en hexoses augmentent au cours du stockage, et V1 a l'IP le plus élevé en fin de stockage et les concentrations en hexoses les plus fortes.

La coloration est également un indicateur d'impuretés (voir le protocole d'analyse en [annexe n°39d](#)). Plus il y a d'hexoses et d'acides aminés présents dans le jus, plus la coloration sera élevée (réaction de Maillard notamment). V1 apparaît comme la variété produisant un jus significativement plus coloré que les deux autres variétés.

Le pH est corrélé au développement de pourriture (R^2 de 0,85 entre le pH du jus avant l'épuration et l'IP ; voir le protocole d'analyse en [annexe n°39e](#)). Il est mesuré une baisse significative du pH en fin de stockage, comparé aux autres points de prélèvement. Et V1 a un pH significativement plus bas que V2 en fin de stockage, V3 est l'intermédiaire, ce qui reflète les résultats d'IP observés dans le chapitre 2.

La vitesse de filtration des jus reflète leur pureté (voir le protocole d'analyse en [annexe n°39f](#)). Moins il y a d'impuretés, plus la filtrabilité est élevée. Un effet lieu est évalué sur cette mesure. Les résultats de l'année 2 montrent que sur le site d'Origny la filtrabilité est significativement plus faible en fin de stockage, notamment pour V1 qui apparaît significativement différente de V2 (vitesse de filtration plus lente).

La mesure du °Brix est comparable à celle de la richesse par polarimétrie, utilisée en centres de réception d'usines. Comme mesuré par HPLC dans le chapitre 2, il n'y a pas de différences significatives au cours du stockage, et la variété V1 est globalement évaluée avec un °Brix, assimilable à la richesse, significativement plus faible que les deux autres variétés.

Les résultats de qualité industrielle semblent refléter les résultats de qualité agronomique des racines. Les jus obtenus de racines stockées à plus de 500°j int sont plus colorés, plus chargés en impuretés et plus difficilement filtrables, soit plus sujet à engendrer des blocages de filtres, des problèmes de cristallisation, ou encore le déclassement du sucre final. Au regard des résultats d'analyses agronomiques, la fin de stockage correspond à des IP plus élevés, des

concentrations en hexoses plus fortes, l'apparition de nouveaux sucres (kestose dans l'arrachage classique et agressif de l'essai CLD d'Origny) et à l'apparition d'esters et d'alcools principalement (cf. résultats des analyses de COV).

Pour aller plus loin dans l'optique de corréler les résultats de qualité agronomique et industrielle, des essais de stockage de longue durée devraient être reconduits, avec notamment la modalité d'arrachage agressif. Il pourrait ainsi être identifié sur quel paramètre du procédé les sucres produits, tels que le kestose, sont néfastes au fonctionnement du procédé. Des solutions adaptées pourraient ainsi être anticipées.

Dans l'objectif de continuer d'associer les analyses physiques et biochimiques aux analyses industrielles, l'analyse de racines dégelées pourrait également faire l'objet d'une étude supplémentaire. Le gel n'est pas un facteur handicapant pour la sucrerie (cf. la partie 1.b. de l'état de l'art), mais le dégel en est un. L'application des mesures physiques et biochimiques (traitées dans ce document) au cas de racines dégelées pourrait fournir des informations sur la structure et la composition des racines, et approfondir les connaissances sur les changements au cours du stockage. Le parallèle avec les mesures de qualité industrielle permettrait d'évaluer l'impact du dégel sur le procédé, et éventuellement, d'identifier des solutions adaptées.

Une autre perspective serait l'amélioration des mesures physiques, notamment l'analyse des fibres et des pectines. La résistance physique apparaît comme une caractéristique intéressante pour le stockage de longue durée. Sa corrélation avec le développement de pourriture est à approfondir, ainsi que sa corrélation avec les éléments structurels de la racine. L'accès à des mesures d'hémicellulose, de cellulose, de lignine et de pectines plus précises permettrait d'approfondir la structure de la MEC des racines, et ainsi d'identifier plus précisément les composés à l'origine de la résistance physique des racines.

Une production de fibres a été mesurée dans l'essai conservation/variétés. Avec des mesures plus précises, la corrélation avec la perte en saccharose pourrait être établie et permettre de compléter l'identification des pertes en saccharose au cours du stockage.

L'effet lieu est évalué sur plusieurs mesures. Il serait intéressant d'approfondir l'effet de ce facteur en faisant le lien avec des analyses de sols, à corréler avec la composition minérale des racines. Ces informations sont disponibles pour les essais traités dans ce document, mais n'ont pas été traitées dans le cadre de la thèse. Les données sur les ions calcium présents dans le sol pourraient être corrélées à celles de résistance physique des racines, par exemple. En reprenant les résultats d'analyse des sels de chaux de l'année 2, les concentrations sont en moyenne plus de 4 fois plus élevées sur le site de Lillers que sur celui d'Origny en fin de stockage. Comme vu dans le chapitre 2, les résistances physiques sont plus élevées sur le site de Lillers en année 2. Il est ici sous-entendu que la disponibilité des ions calcium serait plus importante dans le sol de Lillers. Ces observations et ces hypothèses sont à approfondir.

L'interprétation de ces résultats permettrait d'approfondir les connaissances sur la physiologie des racines, et d'identifier des minéraux-clefs, acteurs de la conservation longue durée.

Enfin, un dernier point sur la nature des contaminations qui représente une information pertinente, notamment pour le procédé industriel. Comme vu dans le chapitre 4, des analyses microbiologiques ont été initiées. Celles-ci doivent inclure les champignons et les levures, et

non pas uniquement l'analyse de la population bactérienne ; et le séquençage doit être approfondi.

La cartographie microbiologique réalisée dans le cadre de la thèse partenaire a initié cette identification complexe. En partenariat avec un laboratoire extérieur, les principaux pathogènes présents sur racines et en process ont été identifiés sur différents sites industriels. L'analyse des acides organiques sur les échantillons de l'essai conservation/varieties et de l'essai CLD d'Origny est disponible. Elle apporterait des informations complémentaires au développement de pourriture mesuré et permettrait d'en savoir plus sur le métabolisme des pathogènes présents.

La mise en place d'inhibiteurs spécifiques aux micro-organismes identifiés serait profitable à l'industrie sucrière. Leur application sur silo prolongerait la durée de stockage des racines en maintenant leur qualité industrielle. Et leur application en usine améliorerait l'extraction du saccharose et réduirait les problèmes de pertes de pH et de blocage des filtres notamment.

Cette thèse en ingénierie des fonctions biologiques a approfondi la connaissance sur les facteurs influençant le stockage des racines, et apporté des éléments nouveaux dans l'explication des changements physiologiques des racines au cours du stockage. Des indicateurs de contaminations sont proposés, et l'analyse des COV offre une nouvelle perspective de travail. Les thèses (partie agronomique et partie industrielle) incitent à poursuivre ce travail d'équipe entre agronomes et industriels, de façon à trouver les solutions les mieux adaptées pour une meilleure conservation des racines, à garantir une extraction industrielle optimisée, et à approfondir l'identification des pertes en saccharose au cours du stockage des racines.

Conclusion générale et perspectives de la thèse

Les analyses chromatographiques ont permis d'approfondir l'identification des pertes en saccharose.

Les pertes par respiration (volatilisation de la matière) et par production de glucose étaient déjà identifiées ; grâce au travail de thèse, de nouvelles molécules sont à présent associées à l'évolution biochimique des racines en silo.

La production de COV par les racines au cours du stockage et en cas de maladies a été mesurée. De futures analyses axées sur la quantification des COV produits permettraient de renseigner avec plus de précisions les pertes par volatilisation. Celles-ci représentent plus de la moitié des pertes de saccharose au cours du stockage.

En complément du glucose, le fructose a pu être quantifié également. La production d'hexoses représente moins de 10 % des pertes en saccharose avec un arrachage classique, et environ 20 % avec un arrachage agressif.

Plus de 75 % des pertes sont identifiées avec les éléments précédents en cas d'arrachage classique, alors que seulement 52 % des pertes en saccharose sont identifiées avec un arrachage agressif.

Comme mis en évidence, les blessures de récolte facilitent les contaminations microbiologiques. Les pathogènes consomment les réserves des racines en métabolisant le saccharose sous la forme de composés adaptés à leur propre métabolisme. De ce fait, le « kestose » est suggéré comme une autre molécule produite, expliquant une partie des pertes en saccharose, en l'occurrence, 25 % en cas d'arrachage agressif.

Il a été constaté que la durée de stockage et l'agressivité de l'arrachage étaient les facteurs prédominants des pertes en saccharose au cours du stockage. Via la respiration et la cicatrisation, les racines consomment de l'énergie pour leur propre métabolisme, et en cas de contaminations par des pathogènes, le saccharose est transformé en d'autres molécules, notamment via le métabolisme des fructanes (« kestose ») et des cétoacides, comme mentionné dans l'analyse des COV.

Un silo perd en moyenne entre 100 et 200 g de saccharose par jour par tonne de racines [Draycott, p. 387, 2006]. Ce sont les pertes quantifiées dans le cadre de cette étude pour un arrachage classique. Elles sont deux fois plus importantes qu'en cas d'arrachage manuel.

Les pertes de saccharose engendrées par un arrachage agressif sont estimées à 495 g/T/j dans le cadre de l'essai CLD d'Origny, soit plus du double des pertes engendrées par un arrachage classique.

Dans la perspective des longues campagnes, Tereos s'est préparé à l'allongement de la durée de stockage des racines. Depuis 2003, le service agronomique organise des essais de conservation longue durée afin de suivre les pertes de saccharose au cours du stockage et de déterminer les meilleures protections pour les silos.

Une sensibilisation accrue a également été mise en place auprès des planteurs de façon à réduire les blessures de récolte et à optimiser le stockage en silo. Les préconisations formulées

suggèrent un scalpage léger des racines, un arrachage en conditions sèches de façon à limiter la tare-terre et favoriser l'ambiance des silos (hygrométrie limitée et ventilation optimisée). Le respect de la date d'arrachage, calculée à partir de la date d'enlèvement du silo, détermine la durée de stockage des racines et est essentiel pour le respect du cumul des 250°j ext (350°j int environ), dans la mesure du possible.

Par ces travaux de thèse, l'importance des facteurs durée de stockage et arrachage est confirmée et quantifiée. L'effet lieu est mis en valeur, et nécessiterait une analyse plus poussée.

L'impact du facteur variété est mesuré plus précisément. Son importance pour le stockage de longue durée est mise en avant, et les différences variétales, notamment face à la résistance à la pourriture, sont en partie expliquées par des différences de caractéristiques physiques. Une hiérarchisation argumentée des facteurs a donc pu être établie.

Les connaissances sur la physiologie des racines ont été approfondies, et permettent d'orienter les futurs essais. Les axes prioritaires sont alors attribués à la recherche d'indicateurs de dégradations et à la compréhension des transformations induites par les pathogènes. L'identification des micro-organismes nuisibles au stockage pourrait aboutir à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et efficaces, autant sur le silo qu'en usine.

L'accent est mis sur la limite des 350°j int. Le cumul des températures est déterminant pour la conservation des racines, mais, malheureusement, il est dépendant du climat, facteur difficilement contrôlable. L'intérêt du contrôle de l'ambiance des silos est suggéré, et la recherche de systèmes de ventilation adaptés est une stratégie judicieuse dans l'optique des stockages de longue durée.

La thèse a également permis d'amplifier le dialogue entre les équipes agronomiques, industrielles et de recherche et développement.

La coordination de futurs projets communs axés sur la continuité des travaux de thèse est en cours. Ils ont notamment pour objectif la poursuite de l'identification des pertes en saccharose au cours du stockage, des analyses microbiologiques, et la mise en place de solutions efficaces en faveur de la conservation. Le projet de création d'un outil pratique basé sur un indicateur de dégradation est également poursuivi.

Pour les campagnes de l'après-quota, Tereos vise une restructuration de ses équipes afin de s'adapter au changement et garantir l'efficacité du travail. En matière de conservation des racines, la recherche vise à approfondir les connaissances en matière de physiologie végétale, et l'innovation se projette sur des solutions efficaces et adaptées.

Références bibliographiques

❖ Articles scientifiques :

- **Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R. and Abbaszadeh, A.** (2014) Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. Journal de Mycologie Médicale, **24**, 51-56.
- **Akeson, W.R. and Stout, E.L.** (1978) Effect of impact damage on sucrose loss in sugarbeets during storage. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **20**, 167-173.
- **Akeson, W.R. and Stout, E.L.** (1980) Differences among sugarbeet cultivars in sucrose loss during storage. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **21**, 80-91.
- **Allen, P.J. and Bacon, J.S.D** (1955) Oligosaccharides formed from sucrose by fructose-transferring enzymes of higher plants. Biochemical Journal, **63**, 200-206.
- **Artschwager, E.** (1926) Anatomy of the vegetative organs of the sugar beet. Journal of Agricultural Research, **33**, 143-176.
- **Artschwager, E.** (1930) A study of the structure of sugar beets in relation to sugar content and type. Journal of Agricultural Research, **40**, 876-915.
- **Asaka, O. and Shoda, M.** (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and environmental microbiology, **62**, 4081-4085.
- **Bargabus, R.L.** (2003) Systemic resistance induction by *Bacillus mycoides* isolate Bac J : the mode of action on Beta vulgaris (sugar beet). Dissertation (Montana State University).
- **Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. and Jacobsen, B.J.** (2002) Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. Physiological and Molecular Plant Pathology, **61**, 289-298.
- **Bargabus, R.L. and Jacobsen, B.J.** (2007) Biocontrol elicited systemic resistance in sugarbeet is salicylic acid independent and NPR1 dependent. Journal of sugar beet research, **44**, 17-33.
- **Barlog, P., Grzebisz, W., Peplinski, K. and Szczepaniak, W.** (2013) Sugar beet response to balanced nitrogen fertilization with phosphorus and potassium. Part I. Dynamics of beet yield development. Bulgarian Journal of Agricultural Science, **19**, 1311-1318.

- **Bellin, D., Schulz, B., Soerensen, T.R., Salamini, F. and Schneider, K. (2007)** Transcript profiles at different growth stages and tap-root zones identify correlated developmental and metabolic pathways of sugar beet. Journal of Experimental Botany, **58**, 699-715.
- **Berhal, C., De Clerck, C., Fauconnier, M-L, Levicek, C., Boullis, A., Kaddes, A., Jijakli, H.M., Verheggen, F. and Massart, S. (2007)** First characterization of volatile organic compounds emitted by banana plants. Physiology and Biochemistry, **83**, 422-430.
- **Beringer, H., Koch, K. and Lindhauer, M.G. (1986)** Sucrose accumulation and osmotic potentials in sugar beet at increasing levels of potassium nutrition. Journal of the Science of Food and Agriculture, **37**, 211-218.
- **Biondi, E., Blasioli, S., Galeone, A., Spinelli, F., Cellini, A., Lucchese, C. and Braschi, I. (2014)** Detection of potato brown rot and ring rot by electronic nose : From laboratory to real scale. Talanta, **129**, 422-430.
- **Bloemberg G.V. and Lugtenberg, B.J.J (2001)** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Plant Biology, **4**, 343-350.
- **Boorer, K.J., Loo, D.D.F, Frommer, W.B. and Wright, E.M. (1996)** Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose cotransporter StSUT1. Journal of Biological Chemistry, **271**, 25139-25144.
- **Broadley, M.R., White, P.J, Hammond, J.P., Zelko, I. and Lux, A. (2007)** Zinc in plants. New Phytologist, **173**, 677-702.
- **Bugbee, W.M. (1979)** The effect of plant age, storage, moisture, and genotype on storage rot evaluation of sugarbeet. Phytopathology, **69**, 414-416.
- **Bugbee, W.M. (1982)** Storage rot of sugar beet. The American Phytopathological Society, **66**, 871-873.
- **Bugbee, W.M. (1993)** A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. Phytopathology, **83**, 63-68.
- **Bugbee, W.M. and Cole, D.F. (1975)** Sugarbeet storage rot in the Red River Valley, 1974-1975. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **19**, 20-24.
- **Bugbee, W.M. and Soine, O.C. (1974)** Survival of *Phoma betae* in soil. Phytopathology, **64**, 1258-1260.
- **Bugbee, W.M. and Cole, D.F. (1979)** Comparison of thiabendazole and genetic resistance for control of sugar beet storage rot. Phytopathology, **69**, 1230-1232.
- **Byford, W.J. (1996)** A survey of foliar diseases of sugar beet and their control in Europe. Proceedings of the 59th IIRB Congress. Brussels, February 1996, 1-10.
- **Cakmak, I. (2005)** The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, **168**, 521-530.

- **Calderón, P. and Pontis, H.G.** (1985) Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. Plant Science, **42**, 173-176.
- **Campbell, L.G. and Klotz, K.L.** (2006a) Characterizing sugarbeet varieties for postharvest storage losses is complicated by environmental effects and genotype*environment interactions. Canadian Journal of Plant Science, **87**, 121-127.
- **Campbell, L.G. and Klotz, K.L.** (2006b) Postharvest storage losses associated with *Aphanomyces* root rot in sugarbeet. Journal of Sugar Beet Research, **43**, 113-127.
- **Campbell, L.G. and Klotz, K.L.** (2008) Postharvest storage losses associated with *Rhizomania* in sugar beet. Plant disease, **92**, 575-580.
- **Campbell, L.G., Fugate, K.K. and Niehaus, W.S.** (2011) *Fusarium* yellows affects postharvest respiration rate, sucrose concentration, and invert sugar in sugarbeet. Journal of Sugar Beet Research, **48**, 18-38.
- **Campos, V.P., Canuto de Pinho, R.S. and Freire, E.S.** (2010) Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. Ciência e Agrotecnologia, **34**, 525-535.
- **Cavalaris, C.K. and Gemtos T.A.** (2002) Evaluation of four conservation tillage methods in the sugar beet crop. Agricultural Engineering International, **4**, 1-23.
- **Chee, H.Y., Kim, H. and Lee, M.H.** (2009) *In vitro* antifungal activity of limonene against *trichophyton rubrum*. Mycobiology, **37**, 243-246.
- **Chiou, T-J and Bush, D.R.** (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proceedings of the National Academy of Sciences, **95**, 4784-4788.
- **Choudhary, D.K. and Johri, B.N.** (2009) Interactions of *Bacillus* spp. And plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research, **164**, 493-513.
- **Cole, D.F.** (1979) Effect of cultivar and mechanical damage on respiration and storability of sugarbeet roots. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **19**, 240-245.
- **Collins, D.P. and Jacobsen, B.J.** (2003) Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Biological control, **26**, 153-161.
- **Collins, D.P., Jacobsen, B.J. and Maxwell, B.** (2003) Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. Biological control, **26**, 224-232.
- **Conti, T.R. and Geiger, D.R.** (1982) Potassium nutrition and translocation in sugar beet. Plant Physiology, **70**, 168-172.
- **Cuddihy, J.A., Porro, M.E. and Raiih, J.S.** (2001) The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. Journal American Society of Sugarcane Technologists, **21**, 73-91.

- **Curry H.A. and Perry C.C.** (2007) Silica in plants : Biological, Biochemical and Chemical studies. Annals of Botany, **100**, 1383-1389.
- **Dayan, F.E., Cantrell, C.L. and Duke, S.O.** (2009) Natural products in crop protection. Bioorganic and Medicinal Chemistry, **17**, 4022-4034.
- **De Carvalho, C.C.C.R., and Da Fonseca, M.M.R.** (2006) Carvone : Why and how should one bother to produce this terpene. Food Chemistry, **95**, 413-422.
- **De Jesus Faria, T., Ferreira, R.S., Yassumoto, L., De Souza, J.R.P., Ishikawa, N.K. and De Melo Barbosa, A.** (2006) Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. Brazilian Archives of Biology and Technology, **49**, 867-4871.
- **De Lacy Costello, B.P.J., Evans, P., Ewen, R.J., Gunson, H.E., Ratcliffe, N.M. and Spencer-Phillips, P.T.N.** (1999) Identification of volatiles generated by potato tubers (*Solanum tuberosum* CV : Maris Piper) infected by *Erwinia carotovora*, *Bacillus polymyxa* and *Arthrobacter* sp. Plant Pathology, **48**, 345-351.
- **De Lira Mota, K.S., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W.A., Oliveira Lima, I. and De Oliveira Lima, E.** (2012) Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae* : interaction with ergosterol. Molecules, **17**, 14418-14433.
- **Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, M-L and Du Jardin, P.** (2016) Root-emitted volatile organic compounds : can they mediate belowground plant-plant interactions ? Plant Soil, **402**, 1-26.
- **Doney, D.L., Wyse, R.E. and Theurer, J.C.** (1981) The relationship between cell size, yield, and sucrose concentration of the sugarbeet root. Canadian Journal of Plant Science, **61**, 447-453.
- **Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J** (2004) Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiology, **135**, 1893-1902
- **Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A. and Orlova, I** (2006) Plant volatiles : recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Science, **25**, 417-440.
- **Dufresne, A., Cavaille, J.Y. and Vignon, M.R.** (1997) Mechanical behavior of sheets prepared from sugar beet cellulose microfibrils. Journal of Applied Polymer Science, **64**, 1185-1194.
- **Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V. and Asselin, A.** (1992) Chitinase, chitosanase and β -1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. Plant Science, **84**, 17-24.
- **Echeverria, E., Salvucci, M.E., Gonzalez, P., Paris, G. and Salerno, G.** (1997) Physical and kinetic evidence for an association between sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. Plant Physiology, **115**, 223-227.

- **Eggleston, G.** (2002) Deterioration of cane juice – sources and indicators. Food Chemistry, **78**, 95-103.
- **Eggleston, G. and Harper, W.** (2006) Determination of sugarcane deterioration at the factory : Development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to measure mannitol. Food Chemistry, **98**, 366-372.
- **Eggleston, G., Karr, J., Parris, A. and Legendre, B.** (2008) Viability of an enzymatic mannitol method to predict sugarcane deterioration at factories. Food Chemistry, **111**, 476-482.
- **Eggleston, G., Dilks, A., Blowers, M. and Winters, K.** (2011) Successful application of dextranase in sugar beet factories. Proceedings of the Sugar Beet Research Association, 1-16.
- **Elliott, M.C., Hosford, D.J., Smith, J.I. and Lawrence, D.K.** (1986) Opportunities for regulation of sugar beet storage root growth. Biologia Plantarum, **28**, 1-8.
- **El-Sheikh, A. M. and Ulrich, A.** (1970) Interactions of rubidium, sodium, and potassium on the nutrition of sugar beet plants. Plant Physiology, **46**, 645-649.
- **Etxeberria, E. and Gonzalez, P.** (2003) Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. Journal of Experimental Botany, **54**, 1407-1414.
- **Ezra, D., Hess, W.M. and Strobel, G.A.** (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. Microbiology, **150**, 4023-4031.
- **Fieuw, S. and Willenbrink, J.** (1987) Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in sugar beet plants (*Beta vulgaris* L. ssp. *altissima*). Journal of Plant Physiology, **131**, 153-162.
- **Fieuw, S. and Willenbrink, J.** (1990) Sugar transport and sugar-metabolizing enzymes in sugar beet storage roots (*Beta vulgaris* ssp. *altissima*). Journal of Plant Physiology, **137**, 216-223.
- **Freeman, L.R., Silverman, G.J., Angelini, P., Merritt, J.R. and Esselen, W.B.** (1976) Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. Applied and Environmental Microbiology, **32**, 222-231.
- **Fugate, K.K., Ferrareze, J.P., Bolton, M.D., Deckard, E.L. and Campbell, L.G.** (2012) Postharvest jasmonic acid treatment of sugarbeet roots reduces rot due to *Botrytis cinerea*, *Penicillium claviforme*, and *Phoma betae*. Postharvest Biology and Technology, **65**, 1-4.
- **Fugate, K.K., Ferrareze, J.P., Bolton, M.D., Deckard, E.L., Campbell, L.G. and Finger, F.F.** (2013) Postharvest salicylic acid treatment reduces storage rot in water-stressed but not unstressed sugarbeet roots. Postharvest Biology and Technology, **85**, 162-166.

- **Gaskill, J.O.** (1950) Possibilities for improving storage-rot resistance of sugar beets through breeding. American Society of Sugar Beet Technologists, **6**, 664-669.
- **Gaskill, J.O.** (1951) Progress report on breeding for storage-rot resistance in sugar beets. American Society of Sugar Beet Technologists, 396-410.
- **Geiger, D.R., Ploeger, B.J., Fox, T.C. and Fondy, B.R.** (1983) Sources of sucrose translocated from illuminated sugar beet source leaves. Plant Physiology, **72**, 964-970.
- **Ghareib, H.R.A., Abdelhamed, M.S. and Ibrahim, O.H** (2010) Antioxidative effects of the acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. Weed Biology and Management, **10**, 64-72.
- **Giaquinta, R.T.** (1979) Sucrose translocation and storage in the sugar beet. Plant Physiology, **63**, 828-832.
- **Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J.H.M, Palacios, N., Cross, J., Selbig, J. and Mark Stitt** (2004) A Robot-Based Platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays : comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness, The Plant Cell, **16**, 3304-3325.
- **Goralch, J., Volrath, S., Beiter, G.K., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J.** (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell, **8**, 629–643
- **Gorzelany, J. and Puchalski, C.** (2000) Mechanical properties of sugar beet roots during harvest and storage. International Agrophysics, **14**, 173-179.
- **Grimme Eva** (2004) Effects of mycofumigation using *Muscodor albus* and *Muscodor Roseus* on diseases of sugar beet and chrysanthemum. Thesis
- **Grobben, G.J., Peters, S.W.P.G., Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Hoefnagel, M.H.N., Hugenholtz, J. and Eggink, G.** (2001) Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. Applied and Environmental Microbiology, **67**, 2867-2870.
- **Groot, M.N.N. and de Bont, J.A.M.** (1998) Conversion of Phenylalanine to Benzaldehyde initiated by aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, **64**, 3009-3013.
- **Haagenson, D.M., Klotz, K.L., Campbell, L.G. and Khan, M.F.R.** (2006) Relationships between root size and postharvest respiration rate. Journal of Sugar Beet Research, **43**, 129-144.
- **Haagenson, D.M., Klotz, K.L. and Campbell, L.** (2008) Impact of storage temperature, storage duration, and harvest date on sugarbeet raffinose metabolism. Postharvest biology and technology, **49**, 221-228.

- **Hankin, L. and McIntyre, J.L.** (1977) Production of kestoses (fructosylsucroses) by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Applied and environmental microbiology, **33**, 522-524.
- **Hansen, C.M.** (1950) The distribution of air in sugar beet stock pile ventilation systems. Proceedings of the American Society of Sugar Beet Technologists, **6**, 629-636.
- **Hanson, A.D., and Wyse, R.** (1982) Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. Proceedings of the National Academy of Sciences, **70**, 1191-1198.
- **Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C. and Rhodes, D.** (1985) Betaine synthesis in chenopods : Localization in chloroplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences, **82**, 3678-3682.
- **Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Bakker, W. and Gorris, L.G.M** (1995) The use of carvone in agriculture : sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. Industrial Crops and Products, **4**, 3-13.
- **Hawker, J.S.** (1985) Sucrose. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants, Academic Press, London, 1-51.
- **Hesse, H., Sonnewald, U. and Willmitzer, L.** (1995) Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Molecular Genetics and Genomics, **247**, 515-520.
- **Hitz, W.D., Ladyman, J.A.R and Hanson, A.D.** (1981) Betaine synthesis and accumulation in barley during field water-stress. Crop Science, **22**, 47-54.
- **Hoffmann, C.** (2012) Storability of defoliated and of topped sugar beets. Sugar Industry, **137**, 458-467.
- **Hoffmann, C.M., Huijbregts, T., Van Swaij, N. and Jansen, R.** (2009) Impact of different environments in Europe on yield and quality of sugar beet genotypes. European Journal of Agronomy, **30**, 17-26.
- **Hosford, D.J., Lenton, J.R., Milford, G.F.J., Pocock, T.O. and Elliott, M.C.** (1984) Phytohormone changes during storage root growth in *Beta* species. Plant Growth Regulation, **2**, 371-380.
- **Howard, D. and Anderson, R.G.** (1976) Cell-free synthesis of ethyl acetate by extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Institute of Brewing, **82**, 70-71.
- **Hubbard, N.L., Huber, S.C. and Pharr, D.M.** (1989) Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. Plant Physiology, **91**, 1527-1534.
- **Huber, D.J., Karakurt, Y. and Jeong, J.** (2001) Pectin degradation in ripening and wounded fruits. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, **13**, 224-241.

- **Huijbregts, A.W.M.** (2003) Technical quality assessment of sugar beet in Europe. Session Physiology and Biotechnology, **32**, 451-459.
- **Ibrahim, L., Spackman, V.M.T. and Cobb, A.H.** (2001) An investigation of wound healing in sugar beet roots using light and fluorescence microscopy. Annals of Botany, **88**, 313-320.
- **Jacobsen, B.J.** (2006) Root rot diseases of sugar beet. Matica Srpska Journal for Natural Sciences, **110**, 9-19.
- **Jacobsen, B.J., Zisack, N.K. and Larson, B.J.** (2004) The role of *Bacillus*-based biological control agents integrated pest management systems : plant disease. The American Phytopathological Society, **94**, 1272-1275.
- **Jansen, R.M.C., Wildt, J., Kappers, I.F., Bouwmeester, H.J., Hofstee, J.W. and Van Henten, E.J.** (2011) Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. Annual Review of Phytopathology, **49**, 157-174.
- **Jiménez, E.R.** (2009) Dextranase in sugar industry : A review. Sugar technology, **11**, 124-134.
- **Jorda, J.** (2003) Étude du procédé d'extraction alcaline et de purification des pectines de pulpe de betterave : étude des propriétés chimiques et physico-chimiques. Thèse.
- **Kasprzewska, A.** (2003) Plant chitinases – Regulation and function. Cellular and molecular biology letters, **8**, 809-824.
- **Kenter, C. and Hoffmann, C.M.** (2009) Changes in the processing quality of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) during long-term storage under controlled conditions. International Journal of Food Science and Technology, **44**, 910-917.
- **Klotz, K. and Campbell, L.** (2002) Impact of root disease on storage : carbohydrate impurity formation. Sugarbeet Research and Extension Reports, **32**, 183-185.
- **Klotz, K.L. and Finger, F.L.** (2003) Impact of temperature, length of storage and postharvest disease on sucrose catabolism in sugarbeet. Postharvest biology and Technology, **34**, 1-9.
- **Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M.G. and Vogel, R.F.** (2003) Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. Environmental Microbiology, **69**, 2073-2079.
- **Koster, P.B. and Jorritsma** (1980) De invloed van een aantal teeltfactoren op de ademhaling van suikerbieten bij bewaring. Instituut voor Rationele Suikerproductie. Mededeling 6, 17 pp.
- **Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M. and Gardini F.** (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. Trends Food Science and Technology, **15**, 201–208.
- **Langrand, G., Rondot, N., Triantaphylides, C. and Baratti, J.** (1990) Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. Biotechnology Letters, **12**, 581-586.

- **Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. and Ryals, J.** (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant Journal, **10**, 71–82.
- **Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins : Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **84**, 6750-6754.
- **Leigh, R.A., Rees, T., Fuller, W.A. and Banfield, J.** (1979) The location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). Biochemical Journal, **178**, 539-547.
- **Letang, G.** (1997) La perte d'eau au cours de la réfrigération dans l'air des fruits et des légumes. Ingénieries-EAT, n°11, 41-50.
- **Li, B., Geiger, D.R. and Shieh, W-J** (1992) Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. Plant Physiology, **99**, 1393-1399.
- **Liu, H., Wang, Q., Yu, M., Zhang, Y., Wu, Y. and Zhang, H.** (2008) Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. Plant, Cell and Environment, **31**, 1325-1334.
- **Liu, J., Chinga-Carrasco, G., Cheng, F., Xu, W., Willför, S., Syverud, K. and Xu, C.** (2016) Hemicellulose-reinforced nanocellulose hydrogels for wound healing application. Cellulose, **23**, 3129-3143.
- **Lunn, J.E. and MacRae, E.** (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. Current opinion in plant biology, **6**, 208-214.
- **Luterbacher, M.C., Asher, M.J.C., DeAmbrogio, E., Biancardi, E., Stevenato, P. and Frese, L.** (2004) Sources of resistance to diseases of sugar beet in related *Beta* germplasm : I. Foliar disease. Euphytica, **39**, 105-121.
- **Ma J.F** (2004) Role of Silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. Soil Science and Plant Nutrition, **50**, 11-18.
- **Ma J.F. and Miyake Y.** (2001) Chapter 2 Silicon as a beneficial element for crop plants. Studies in Plant Science, **8**, 17-39.
- **Ma J.F. and Yamaji N.** (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. Trends in Plant Science, **11**, 392-397.
- **Mantovani, G. and Fagioli, F.** (1964). Untersuchungen über die Saccharosekristallisation in Gegenwart von Raffinose. Zeitschrift für die Zuckerindustrie, **14**, 202–5.
- **Marsili, R.T., Miller, N., Kilmer, G.J. and Simmons, R.E.** (1994) Identification and Quantitation of the Primary Chemicals Responsible for the Characteristic Malodor of

Beet Sugar by Purge and Trap GC-MS-OD Techniques. Journal of Chromatographic Science, **32**, 165–171

- **Martens, M. and Oldfield, J.F.T.** (1970) Storage of sugar beet in Europe : report of an IIRB enquiry. Journal of the Institute of Sugar Beet Research, **5**, 102-127.
- **Martin, S.S., Narum, J.A. and Chambers, K.H.** (2001a) Sugarbeet biochemical quality changes during factory pile storage. Part I. Sugars. Journal of Sugar Beet Research, **38**, 35-53.
- **Martin, S.S., Narum, J.A. and Chambers, K.H.** (2001b) Sugarbeet biochemical quality changes during factory pile storage. Part II. Non-sugars. Journal of Sugar Beet Research, **38**, 173-188.
- **McNeil, S.D., Nuccio, M.L. and Hanson, A.D.** (1999) Betaine and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. Plant Physiology, **120**, 945-949.
- **Metzner, R., Van Dusschoten, D., Bühler, J., Schurr, U. and Jahnke, S.** (2014) Belowground plant development measured with magnetic resonance imaging (MRI) : exploiting the potential for non-invasive trait quantification using sugar beet as a proxy. Frontiers in Plant Science, **5**, 1-11.
- **Moore, S.J., An Godshall, M. and Grimm, C.C.** (2004) Comparison of two methods of volatile analysis for determining the causes of off-odors in white beet sugars – SPME and headspace. International Sugar Journal, **105**, 224-229.
- **Moorhead, G.B.G. and Plaxton, W.C.** (1988) Binding of glycolytic enzymes to a particulate fraction in carrot and sugar beet storage roots. Plant Physiology, **86**, 348-351.
- **Morel du Boil, P.G.** (1991) The role of oligosaccharides in crystal elongation. Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association, **65**, 171-178.
- **Morris, G.A., Castile, J., Smith, A., Adams, G.G. and Harding, S.E.** (2010) The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectine solutions and gels. Polymer Degradation and Stability, **95**, 2670-2673.
- **Moschou, E.A., Sharma, B.V., Deo, S.K. and Daunert, S.** (2004) Fluorescence glucose detection : advances toward the ideal *in vivo* biosensor. Journal of Fluorescence, **14**, 535-547.
- **Mumford, D.L. and Wyse, R.E.** (1976) Effect of fungus infection on respiration and reducing sugar accumulation of sugarbeet roots and use of fungicides to reduce infection. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **19**, 157-162.
- **Nicolaï, B.M., Defraeye, T., De Ketelaere, B., Herremans, Els, Hertog, M.L.A.T.M., Saeys, W., Torricelli, A., Vandendriessche, T. and Verboven, P** (2014) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality. Annual Review of Food Science and Technology, **5**, 285-312.

- **Nielsen, M.N., Sorensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C.** (1998) Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, **64**, 3563-3569.
- **Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiology, **147**, 1251-1263.
- **Oldfield, J.F.T, Dutton, J.V. and Houghton, B.J.** (1971a) Deduction of the optimum conditions of storage from studies of the respiration rates of beet. International Sugar Journal, **73**, 326-330.
- **Oldfield, J.F.T, Dutton, J.V. and Teague, H.J.** (1971b) The significance of invert and gum formation in deteriorated beet. International Sugar Journal, **73**, 3-8, 35-40, 66-68.
- **Olsson, R.** (2011) Sustainable harvest and storage of sugar beets – more beet and more sugar to the factory – variety and storage 2010-2011. NBR Report 611-2010-2011, 34 pp.
- **Omran, S.M., Moodi, M.A., Amiri, S.M.B.N., Mosavi, S.J., Saeed, S.A.M.G.M., Shiade, S.M.J., Kheradi, E. and Salehi, M.** (2011) The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage fungi. International journal of molecular and clinical microbiology, **1**, 82-86.
- **Oosterhaven, K., Poolman, B. and Smid, E.J.** (1995) S-Carvone as a natural potato sprout inhibiting fungistatic and bacteriostatic compound. Industrial Crops and Products, **4**, 23-31.
- **Peng, M. and Kuc, J.** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. Physiology and Biochemistry, **82**, 696-699.
- **Peto, F.H.** (1952) Effect of frost on sugar content in beets. The American society of sugar beet technologists, **7**, 108-111.
- **Pickup, J.C., Hussain, F., Evans, N.D., Rolinski, O.J and Birch, D.J.S** (2005) Fluorescence-based glucose sensors. Biosensors and Bioelectronics, **20**, 2555-2565.
- **Pool, V.W. and McKay, M.B.** (1914) *Puccinia subnitens* on the sugar beet. Phytopathology, **4**, 204-206.
- **Pressey, R.** (1968) Invertase inhibitors from red beet, sugar beet, and sweet potato roots. Plant Physiology, **43**, 1430-1434.
- **Ramos, E.L. and Ravelo, S.** (2009) Sugarcane oligosaccharides and their impact on sucrose quality and factory efficiency. Sugar Technology, **11**, 185-188.
- **Rao, M., Fredeen, A.L. and Terry, N.** (1990) Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. Plant Physiology, **92**, 29-36.

- **Rearick, D.E., McKay, C. and Simantel, G** (1993). Betaine content of sugar beet varieties. Journal of Sugar Beet Research, **30**, 112.
- **Reinefeld, E.** (1975). Discussion of paper 'Effect of dextran on second carbonatation filtration. In Comptes Rendus de la XV^{me} Assemblée Générale de la Commission Internationale Technique de Sucrierie, p. 247.
- **Roboz, E. and Van Hook, A.** (1946) Chemical study of beet pectin. Proceedings of the American Society of Sugar Beet Technologists, **4**, 574-583.
- **Romano, P. and Suzzi, G.** (1996) Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. Applied and Environmental Microbiology, **62**, 309-315.
- **Rontein, D., Basset, G. and Hanson, A.D.** (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. Metabolic engineering, **4**, 49-56.
- **Roem, E.S., Walker, H.G. and McCready, R.M.** (1959) Biosynthesis of sucrose and sucrose-phosphate by sugar beet leaf extracts. Plant Physiology, **35**, 272-269.
- **Rosenkranz, H., Vogel, R., Greiner, S. and Rausch, T.** (2001) In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. Journal of Experimental Botany, **52**, 2381-2385.
- **Ruiz-Holst, M., Martin, F.D., Burba, M., Elias, P.D. and Diener, G.** (2003) Assessment of the technical quality of sugar beet in Southern Spain. Zuckerindustrie, **128**, 879-887.
- **Ruppel, E.G.** (1986) Foliar diseases caused by fungi. Compendium of beet diseases and insects, APS Press, St Paul, MN, 8-9.
- **Ruppel, E.G. and Tomasovic, B.J.** (1977) Epidemiological factors of sugar beet powdery mildew. Phytopathology, **67**, 619-621.
- **Russell, B.L., Rathinasabapathi, B. and Hanson, A.D.** (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. Plant Physiology, **116**, 859-865.
- **Saftner, R.A., Daie, J. and Wyse, R.E.** (1983) Sucrose uptake and compartmentation in sugar beet taproot tissue. Plant Physiology, **72**, 1-6.
- **Sahai, A.S. and Manocha, M.S.** (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. FEMS Microbiology reviews, **11**, 317-338.
- **Saftner, R.A. and Wyse, R.E.** (1980) Alkali cation/sucrose co-transport in the root sink of sugar beet. Plant Physiology, **66**, 884-889.
- **Saftner, R.A. and Wyse, R.E.** (1984) Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue discs. Plant Physiology, **74**, 951-955.
- **Sauer, N.** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. FEBS Letters, **581**, 2309-2317.

- **Schade, F., Thompson, J.E. and Legge, R.L.** (2003) Use of a plant-derived enzyme template for the production of the green-note volatile hexanal. Biotechnology and bioengineering, **84**, 265-273.
- **Schadeweg, V. and Boles, E.** (2016) n-Butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA. Biotechnology for Biofuels, **9**, 265-273.
- **Schnepel, K. and Hoffmann, C.M.** (2014) Genotypic variability in storage losses of sugar beet. Agriculture, n°5, 302-310.
- **Schnepel, K. and Hoffmann, C.M.** (2016) Genotypic differences in storage losses of sugar beet – causes and indirect criteria for selection. Plant Breeding, **135**, 130-137.
- **Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., and Lewinsohn, E.** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. The Plant Journal, **54**, 712-732.
- **Seethapathy, P., Gurudevan, T., Subramanian K.S. and Kuppusamy, P.** (2016) Bacterial antagonists and hexanal-induced systemic resistance of mango fruits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot. Journal of Plant interactions, **11**, 158-166.
- **Shi, S., Si, T., Liu, Z., Zhang, H., Ang, E.L. and Zhao H.** (2016). Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Scientific reports, **6**, 1-10.
- **Shore, M.** (1957). The formation of lactic acid in relation to sugar loss. In Proceedings of the Xth General Assembly of the Commission Internationale Technique de Sucrierie, pp. 196-202.
- **Si, T., Luo, Y., Xiao, H. and Zhao, H.** (2014) Utilizing an endogenous pathway for 1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic engineering, **22**, 60-68.
- **Smith, G.A. and Ruppel, E.G.** (1971) Cercospora Leaf Spot as a predisposing factor in storage rot of sugar beet roots. Phytopathology, **61**, 1485-1487.
- **Snyder, F.W.** (1971) Some agronomic factors affecting processing quality of sugarbeets. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **16**, 496-507.
- **Spackman, V.M.T and Cobb, A.H.** (2001) An enzyme-based method for the rapid determination of sucrose, glucose and fructose in sugar beet roots and the effects of impact damage and postharvest storage in clamps. Journal of the Science of Food and Agriculture, **82**, 80-86.
- **Spinelli, F., Cellini, A., Marchetti, L., Nagesh, K.M. and Piovene, C.** (2011) Emission and function of volatile organic compounds in response to abiotic stress. InTech, 367-395.
- **Srinivas, P. and Danielson, D.** (2001) Effect of the chemical inducer Actigard in inducing resistance to bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcate* (Forster) (Coleoptera :

Chrysomelidae), feeding in soybean.. Journal of Agricultural and Urban Entomology, **18**, 1-8.

- **Steen, E.J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C.J., Redding, A., Ouellet, M. and Keasling, J.D.** (2008) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. Microbial Cell Factories, **7**, 1-8.
- **Steensen, J.K. and Augustinussen, E.** (2003) Effect of rubber flail topping and scalping versus non-scalping on yield, internal quality, and storage losses in sugarbeet. Zuckerind, **128**, 100-105.
- **Syu, M.J.** (2001) Biological production of 2,3-butanediol. Applied Microbiology and Biotechnology, **55**, 10-18.
- **Tallgren, A.H., Airaksinen, U., Von Weissenberg, R., Ojamo, H., Kuusisto, J. and Leisola, M.** (1999) Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. Applied and Environmental Microbiology, **65**, 862-864.
- **Thavong P., Archbold D.D., Pankasemsuk T. and Koslanund R.** (2011) Hexanal vapours suppress spore germination, mycelial growth and fungal- derived cell wall degrading enzymes of postharvest pathogens of longan fruit. Chiang Mai Journal of Science, **38**, 139–150.
- **Terry, N. and Ulrich, A.** (1973) Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. Plant Physiology, **51**, 783-786.
- **Thompson, S.** (2009) Microbiological spoilage of high-sugar products. From book : Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, 301-324.
- **Thrane, C., Nielsen, T.H., Nielsen, M.N., Sorensen, J. and Olsson, S.** (2000) Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, **33**, 139-146.
- **Tiekling, M. and Gänzle, M.G.** (2005) Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. Trends in Food Science and Technology, **16**, 79-84.
- **Tracey, R. P. and Britz, T.J.** (1989) Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, **55**, 1617–1623.
- **Trzebinski, J., El-Rakabawy, N. and Labedzka, E.** (1985). Effect of mineral fertilization and genetic variability on the content of betaine in sugar beet plants. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin, **158**.
- **Ulrich, A.** (1954) Influence of night temperature and nitrogen nutrition on the growth, sucrose accumulation and leaf minerals of sugar beet plants. Plant Physiology, **30**, 250-257.
- **Vaccari, G., Marzola, G., Mantovani, G., Bentini, M., Baraldi, G. and Spettoli, P.** (1988) Chemical and enzymatic changes in strongly damaged beets. Food Chemistry, **27**, 203-211.

- **Vandendriessche, T., Nicolai, B.M. and Hertog, M.L.A.T.M.** (2012) Optimization of HS SPME fast GC-MS for High-throughput analysis of strawberry aroma. Food Analytical Methods, **6**, 512-520.
- **Van Balken, J.A.M, Van Dooren, T.J.G.M., Van den Twell, W.J.J., Kamphuis, J., Meijer, E.M.** (1991) Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1F-fructosyltransferase. Applied Microbiology and Biotechnology, **35**, 216-221.
- **Van den Ende, W., De Coninck, B., Clerens, S., Vergauwen, R. and Van Laere, A.** (2003) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants : characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel “cell-wall invertase-like” specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). The Plant Journal, **36**, 697-710.
- **Van den Ende, W., De Coninck, B., and Van Laere, A.** (2004) Plant fructan exohydrolases : a role in signaling and defense ? TRENDS in Plant Science, **9**, 523-528.
- **Van Soest, P.J. and Robertson, J.B.** (1979) Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. Standardization of Analytical Methodology for Feeds, **134e**, 49-60.
- **Vas, G. and Vékey, K.** (2004) Solid-phase microextraction : a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal of Mass Spectrometry, **39**, 233-254.
- **Vukov, K. and Hangyál, K.** (1985) Sugar beet storage. Sugar Technology Reviews, **12**, 143-265.
- **White, P.J. and Broadley, M.R.** (2003) Calcium in plants. Annals of Botany, **92**, 487-511.
- **Winzer, T., Lohaus, G. and Heldt, H-W.** (1996) Influence of phloem transport, N-fertilization and ion accumulation on sucrose storage in the taproots of fodder beet and sugar beet. Journal of Experimental Botany, **47**, 863-870.
- **Wood** (1952) Selection for cold tolerance and low temperature germination in sugar beets. Proceedings American Society of Sugar Beet Technologists, **8**, 407-410.
- **Wyse, R.E.** (1970) General postharvest physiology of the sugarbeet root. United States Department of Agriculture's – Agricultural Research Service, 47-64
- **Wyse, R.E.** (1978a) Effect of harvest injury on respiration and sucrose loss in sugarbeet roots during storage. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **20**, 193-202.
- **Wyse, R.E.** (1978b) Effect of low and fluctuating temperatures on the storage life of sugarbeets. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **20**, 33-42.
- **Wyse, R.E.** (1979) Parameters controlling sucrose content and yield of sugarbeet roots. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **20**, 369-385.

- **Wyse, R.E. and Dexter, S.T.** (1970) Effect of agronomic and storage practices on raffinose, reducing sugar, and amino acid content of sugarbeet varieties. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **16**, 369-383.
- **Wyse, R.E. and Peterson C.L.** (1978) Effect of injury on respiration rates of sugarbeet roots. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **20**, 269-280.
- **Yamada, N., Takahashi, H., Kitou, K., Sahashi, K., Tamagake, H., Tanaka, Y. and Takabe, T.** (2015) Suppressed expression of choline monoxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine. Plant Physiology and Biochemistry, **96**, 217-221.
- **Zamski, E. and Azenkot, A.** (1981) Sugarbeet vasculature. I. Cambial development and the three-dimensional structure of the vascular system. Botanical Gazette, **142**, 334-343.
- **Zhang, Q. and Greenway, H.** (1994) Anoxia tolerance and anaerobic catabolism of aged beetroot storage tissues. Journal of Experimental Botany, **45**, 567-575.
- **Zielke, R.C. and Snyder F.W.** (1973) Impurities in sugarbeet crown and root. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, **18**, 60-75.

❖ Livres :

- **Burdock, G.A.** (2010) Fenaroli's handbook of Flavor Ingredients sixth edition. CRC Press.
- **Davies, D.D.** (1980) Metabolism and respiration : The biochemistry of plants. Academic Press, INC.
- **Draycott, A.P.** (2006) Sugar beet. Blackwell Publishing Ltd.

❖ Tereos et autres professionnels de l'industrie sucrière :

- **Amalgamated Sugar Company** (2016) The Sugarbeet - Harvest 2016.
- **CEDUS** (2012) Betterave (*Beta vulgaris*).
- **Coordination Bett Research International (COBRI)** (2013) Long-term storage of sugar beet in North-West Europe, n°1.
- **Decloux, M.** (2002) Procédés de transformation en sucrerie (parties 1 et 2).
- **ITB** (2013) Protection contre les maladies du feuillage en 2013. La Technique betteravière, n°978.
- **ITB** (2004) La Technique Betteravière n°818, la fertilisation azotée.
- **ITB et IRBAB** (2007) Réduire la tare déchet et optimiser le déterrage des betteraves.
- **IRBAB** (2014) Fungi-Memo 2014, Pour une protection optimale contre les maladies foliaires en betterave, Le Betteravier.

- **IRBAB** (2014) Techniques culturales betteravières, Le Betteravier.
 - **Legrand, G. et Wauters, A.** (2013) Conservation des betteraves à long terme et protection des tas de betteraves contre le gel. IRBAB, Les guides techniques.
 - **Syndicat National des Fabricants de Sucre (SNFS) et Groupement Technique de Sucreries (GTS)** (1971) Évolution des pertes de sucre au cours de la conservation des betteraves.
 - **Tereos** (2017) Agroinfos n°55.
 - **Tereos** (2017) Essai conservation longue durée d'Origny.
 - **Tereos** (2016) Fiche Agro : CIPAN.
 - **Tereos** (2015) Essai conservation longue durée d'Origny.
 - **Tereos** (2015) Essai conservation/stockage, silo chaulé/non-chaulé.
 - **Tereos** (2015) Visite à Amalgamated Sugar Company et échanges avec Denis Searne, responsable agronomique chez Amalgamated Sugar Company dans l'Idaho.
 - **Tereos** (2014) Essai conservation variété – Lesquielles - Correspondance indice de pourriture et taux de pourriture.
 - **Tereos** (2013) Essai conservation longue durée, protections contre le gel.
 - **Tereos** (2013) Essai conservation/variétés.
 - **Tereos** (de 2009 à 2017) Essai conservation très longue durée à Chaudun.
 - **Tereos** (de 2003 à 2017) Essai conservation longue durée d'Origny .
 - **Tereos** (2011) Le paillage (Jean-Michel Chassine), Betteravenir.
 - **Tereos** (2010) Essais paillage.
- ❖ Professionnels des équipements de laboratoire :
- **Agilent Technologies** (2012) Manuel d'utilisation – Détecteur à indice de réfraction Agilent Infinity série 1260.
- ❖ Sites internet et ressources en ligne :
- **Agricultural marketing resource center (AgMRC)**, 2012.
 - **Eurostat** (1996) Union Européenne et pays de l'Est de l'Europe.
 - **Le Figaro** (2016) Betteraves : rendements décevants en 2016.
 - **Morrison, S** (2006) Statistique Canada, Recensement de l'agriculture, 1911 à 2006
 - **Sigma-Alrich**, Matrice Extra Cellulaire (MEC) végétale
 - **United States Department of Agriculture – Economic Research Service (USDA ERS)**, 2017.

Résumé de la thèse

À la recherche de solutions innovantes et prometteuses pour l'adaptation à l'abolition des quotas de production, Tereos, coopérative agricole, leader du marché du sucre en France, s'intéresse aux changements physiologiques subis par les racines de betteraves sucrières au cours du stockage. L'étude des facteurs impactant le stockage des racines, l'analyse des modifications physiques et biochimiques, et l'identification d'indicateurs de dégradation ont fait l'objet de cette thèse.

Ce travail a été mené en collaboration avec le service industriel. Le lien entre la qualité agronomique et la qualité industrielle des racines est pour la première fois abordé dans un projet commun. En effet, les transformations physiques et biochimiques subies par les racines pendant la conservation en silo induisent la production de nouvelles molécules, dont certaines sont nuisibles à l'extraction du saccharose.

Par des tests de résistances physiques et des analyses chromatographiques, certains changements physiologiques des racines sont identifiés, et les pertes en sucre au cours du stockage sont approfondies. Grâce à l'introduction de projets nouveaux, telles que l'étude des composés organiques volatils et les analyses microbiologiques, des indicateurs de dégradations des racines sont suggérés.



Thesis summary

Searching for innovative and favourable solutions in order to adapt to the abolition of production quotas, Tereos, an agricultural cooperative, leader of the French sugar market, is interested in the physiological changes which occur in the sugar beet roots during storage. The study of factors affecting the storability of roots, the analysis of physical and biochemical changes, and the identification of degradation indicators, are the main objectives of this thesis. This work was carried out in collaboration with the industrial direction. The link between the agronomical quality and the industrial quality is addressed for the first time in a joint project.

Indeed, the physical and biochemical transformations suffered by roots during the conservation in piles induce the production of new molecules, and some of them are harmful for the sucrose extraction.

With physical resistance tests and chromatographic analysis, some of the physiological changes of the roots are identified, and the sugar losses during storage are detailed. Thanks to the introduction of new projects, as the study of volatile organic compounds and microbiological analysis, indicators of root degradations are suggested.

Mots clefs : Betterave sucrière ; Conservation ; Facteurs environnementaux ; Pathogènes ; Physiologie végétale ; Saccharose ; Stockage en silo ; Sucre ; Racine ; Variété.

Key words : Sugar beet ; Conservation ; Environmental factors ; Pathogens ; Plant physiology ; Sucrose ; Clamp storage ; Sugar ; Root ; Variety.