

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
I.1 – LES PRAIRIES, UNE BIODIVERSITE RICHE DE PLUS EN PLUS SOLLICITEE PAR L’HOMME.	1
I.2 – LA GERMINATION, FACTEUR CLEF DE LA VALEUR AGRO-ECONOMIQUE ET ECOLOGIQUE D’UNE PRAIRIE.	1
I.3 – LE CHANGEMENT CLIMATIQUE MENACE LA BIODIVERSITE ET LES SERVICES RENDUS PAR LES PRAIRIES.	2
I.4 – LES PRAIRIES FACE AU CHANGEMENT CLIMATIQUE, LE PROJET INRA CLIMAGIE.	2
I.5 – L’INRA DE LUSIGNAN : TEMPERATURES ET GERMINATION D’ESPECES PRAIRIALES SAUVAGES.	2
I.6 – LE RAY-GRASS ANGLAIS, DES FOURRAGES AUX GAZONS, UNE ESPECE MAJORITAIRE.	3
I.7 – GENESE ET OBJECTIFS DU PROJET ReGATe.	3
I.8 – LA SNES, LABORATOIRE DE REFERENCE DU GEVES POUR LES ESSAIS SUR SEMENCES.	4
I.9 – L’ANALYSE D’IMAGE A LA SNES, UN SUIVI FIN DES ESSAIS DE GERMINATION.	5
I.10 – LA SNES ET LE PROJET ReGATe, PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DU STAGE.	6
II. MATERIEL BIOLOGIQUE ET TECHNIQUE	7
II.1 – TROIS POPULATIONS DE RAY-GRASS ANGLAIS ETUDIEES SUR DEUX LOTS, L’UN COLLECTE, L’AUTRE MULTIPLIE AU CRG (LOTS ANCIENS ET RECENTS).	7
II.2 – LES BANCs DE GERMINATION DE TYPE JACBOSEN DE LA SNES.	7
II.3 – UN SEMIS MANUEL A 4 TEMPERATURES, DIRECTEMENT SUR BANCs.	8
II.4 – LE SEMIS A 26°C DU LOT RECENT R2, CONTROLE BIOLOGIQUE DE L’HOMOGENEITE DES BANCs.	8
II.5 – DU MOIS A LA SEMAINE, LA DUREE DES ESSAIS INITIAUX DIMINUE AVEC LA TEMPERATURE.	9
II.6 – LE DEVELOPPEMENT PLUS LENT DES LOTS ANCIENS IMPLIQUE UN PROLONGEMENT DES ESSAIS INITIAUX.	9
II.7 – CONTROLE DE LA VIABILITE DES SEMENCES AU CHLORURE DE TETRAZOLIUM.	9
III. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D’ANALYSE D’IMAGES	10
III.1 – L’ACQUISITION AUTOMATIQUE DES DONNEES DE GERMINATION PAR ANALYSE D’IMAGES.	10
III.2 – L’ANALYSE D’IMAGE REALISEE SOUS LE LOGICIEL LIBRE IMAGE J II, DEVELOPPEMENT DE MACROS.	10
III.3 – LA MACRO GENERALE DEVELOPPEE PAR DIDIER DEMILLY : ‘GERMINATION’.	10
DECOUPER LES SERIES D’IMAGES, UNE ETAPE ANODINE MAIS PUISSANTE.	10
LA SEGMENTATION DES SEMENCES ET RADICULES, CLEF DE L’ANALYSE DE GERMINATION.	11
III.4 – L’OBJECTIF TECHNIQUE : SEGMENTER LES SEMENCES DE RAY-GRASS ANGLAIS.	11
LES REGLAGES PHYSIQUES	11
DEUX MACROS DE SEGMENTATION POUR DEUX QUALITES D’IMAGES.	12
III.5 – CREATION DE LA GRILLE, TRAITER LES SEMENCES INDIVIDUELLEMENT.	12
III.6 – DEUX VARIABLES POUR DETERMINER L’IMAGE DE GERMINATION D’UNE SEMENCE.	13
LA SEGMENTATION DE LA RADICULE TRANSLUCIDE IMPOSSIBLE.	13
L’ALTERNATIVE : LE DEPLACEMENT DE LA SEMENCE COMME INDICATEUR DE GERMINATION.	13
L’IMAGE DE REFERENCE	14
LE DEPLACEMENT DU CENTRE D’INERTIE DES SEMENCES : UN SEUIL INDICATEUR DE GERMINATION FIXE A 0,4MM.	14
FAUX NEGATIFS ET POSITIFS, QUAND LES SEMENCES QUITTENT LEURS « CASES ».	14
III.7 – LE TRAITEMENT DES DONNEES.	15
AJUSTEMENT ET CONTROLE DE L’AUTOMATISATION PAR COMPTAGE VISUEL, LES DONNEES LECTEUR.	15
COMPARAISONS STATISTIQUES, DES ANALYSES CLASSIQUES AU TEST DU LOG-RANK.	15

IV. RESULTATS DE GERMINATION EN FONCTION DE LA TEMPERATURE	17
IV.1 – DES CONDITIONS THERMIQUES SPATIALES ET TEMPORELLES HOMOGENES POUR ETUDIER LA GERMINATION.	17
IV.2 – LES DONNEES LECTEUR, REPRODUCTIBLES ET FIABLES.	17
IV.3 – DES REPETITIONS HOMOGENES A 26°C.	18
IV.4 – DES CONDITIONS D’ESSAI HOMOGENES POUR DES ESSAIS REPETABLES.	19
IV.5 – COMPARAISON DES COURBES DE GERMINATION CUMULEES DES 3 POPULATIONS RAY-GRASS ANGLAIS PAR LOT ET SELON LA TEMPERATURE.	19
LA VARIABILITE GENETIQUE DE LA GERMINATION MISE EN EVIDENCE AUX BASSES TEMPERATURES POUR LES LOTS RECENTS.	20
LE TEMPS DE GERMINATION MOYEN, LA POPULATION R2 SE DEMARQUE PAR SON RETARD AUX BASSES TEMPERATURES.	21
IV.6 – COURBES DE GERMINATION CUMULEES DES LOTS ANCIENS, L’EFFET DU VIEILLISSEMENT.	21
LA GERMINATION DES LOTS ANCIENS R1 ET R3, FAVORISEE AUX TEMPERATURES BASSES.	21
UNE POPULATION R2 BIEN PLUS TOLERANTE AU VIEILLISSEMENT ?	22
LE VIEILLISSEMENT ET/OU LE FROID RETARDENT LA GERMINATION.	22
IV.7 – LES BOITES A MOUSTACHES, COMPARAISON ENTRE REPETITIONS DES TAUX ET TEMPS MOYENS DE GERMINATION.	23
LE TAUX DE GERMINATION DES LOTS RECENTS, LES MAXIMUMS R1 ET R3 SEMBLABLES.	23
LA GERMINATION DES LOTS ANCIENS, FAVORISEE A 10 ET 15°C.	23
LA VITESSE MOYENNE DE GERMINATION DES LOTS RECENTS, R2 A LA TRAINE.	24
IV.8 – L’ACQUISITION AUTOMATIQUE DES DONNEES DE GERMINATION.	24
UNE METHODE FONCTIONNANT POUR 91% DES SEMENCES SUIVIES.	24
DONNEES LECTEUR ET AUTOMATIQUES, UN DECALAGE MOYEN DE 4H SYNCHRONISE A 94%.	25
LES COURBES DE GERMINATION CUMULEES AUTOMATIQUES DES LOTS RECENTS.	25
LES COURBES DE GERMINATION CUMULEES AUTOMATIQUES DES LOTS ANCIENS.	26
LE GAIN DE TEMPS ET DE PRECISION OFFERT PAR LA METHODE AUTOMATIQUE.	26
V. CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS	27
V.1 – BILAN DE LA METHODE AUTOMATIQUE DEVELOPPEE.	27
UNE METHODE FONCTIONNANT AUSSI POUR LA FETUQUE ELEVEE.	27
AMELIORER L’ACQUISITION AUTOMATIQUE : GROUPEZ LES LOTS PAR VITESSES DE DEVELOPPEMENT.	28
AMELIORER L’ACQUISITION AUTOMATIQUE : UN PAPIER SUR MESURE.	28
V.2 – EXISTE-T-IL UNE VARIABILITE INTRA-SPECIFIQUE DANS LA REPONSE GERMINATIVE A LA TEMPERATURE CHEZ LES POPULATIONS SAUVAGES DE RAY-GRASS ANGLAIS ?	29
V.3 – LE VIEILLISSEMENT D’UN LOT DE SEMENCE ENTRAINE-T-IL UNE MODIFICATION DE LA REPONSE GERMINATIVE A LA TEMPERATURE ?	30
V.4 – SUITE DU PROGRAMME ReGATe, LE VIEILLISSEMENT CONTROLE DES LOTS RECENTS.	31
BIBLIOGRAPHIE	32

Glossaire

Les définitions non sourcées proviennent de mes propres connaissances et/ou des échanges entretenus au cours du stage avec l'ensemble des membres du GEVES.

HSB ou HSL : HSB ou HSL pour Hue Saturation Brightness ou Lightness, en français Teinte Saturation Valeur ou Lumière correspond à la transformation des canaux RGB d'une image en composantes de couleur et de luminosité (Gupta & Ibaraki 2014).

Lot : Groupe de semences issues des mêmes plants parents, pour un même évènement de production. Dans le cadre du stage, sont étudiés des lots anciens et récents de mêmes variétés de ray-grass anglais.

Macro : Sous-programme informatique plus ou moins complexe, codé dans un langage lu par le logiciel exploitant, permettant d'effectuer une suite d'opérations finies permettant d'aboutir à un résultat (on parle aussi d'algorithme). Les macros de segmentation développées pendant le stage permettent de réaliser automatiquement la segmentation des semences étudiées (Demilly *et al.* 2014).

Pixel : Le plus petit élément constitutif d'une image. Plus le nombre de pixels est important, plus la définition est nette (Gupta & Ibaraki 2014).

Radicule : Ebauche de racine de l'embryon. Son allongement conduit à la percée des enveloppes séminales et marque la fin du véritable processus de germination. Elle est d'ordinaire à l'origine de la totalité du système racinaire de la plante à laquelle l'embryon donne naissance (Côme & Corbineau 2006).

RGB : RGB pour Red Green Blue (Rouge Vert Bleu) correspond à la caractérisation des pixels d'une image par trois couleurs uniquement. Pour un même pixel, chaque canal est ainsi plus ou moins exprimé (de 0 à 255) et permet d'obtenir des nuances de couleurs sur l'ensemble de l'image (Gupta & Ibaraki 2014).

Segmentation : En analyse d'image, la segmentation correspond au processus séparant en classes distinctes, selon divers critères, les pixels d'une image (Gupta & Ibaraki 2014).

Semence : Dans son acceptation la plus large, le mot semence recouvre toutes les entités que produisent les végétaux supérieurs pour assurer leur multiplication. Il regroupe notamment les graines et les organes similaires tels que les grains ou caryopses dans le cas des Poacées (ray-grass anglais) (Côme & Corbineau 2006).

Seuil binaire (Binary thresholding) : Correspond à une segmentation des pixels en deux classes. Les pixels de l'image sont noirs ou blancs seulement, suivant un critère spécifique (Gupta & Ibaraki 2014).

Variété population : Les variétés populations sont formées par la multiplication en masse, avec ou sans sélection, d'une population naturelle (écotype), ou artificielle. Les semences d'une même variété population présente donc un grand nombre de géotypes différents (Gallais 2011).

Liste des abréviations

ACVF : Association des Créateurs de Variétés Fourragères.

CASDAR : Compte d'Affection Spécial au Développement Agricole et Rural.

CLIMAGIE : Analyse et valorisation de stratégies agro-écologiques intra- et inter-spécifiques pour adapter les communautés prairiales au changement Climatique. Amélioration Génétique et Intensification Ecologique.

CRG : Centre de Ressources Génétiques des espèces fourragères et à gazons.

ESEO : Ecole Supérieure d'Electronique de l'Ouest.

GEVES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences.

GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants.

HSB : Hue Saturation Brightness, TSV/L en français pour Teinte Saturation Valeur/Lumière.

HSV : Hue Saturation Lightness, TSV/L en français pour Teinte Saturation Valeur/Lumière.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

ISTA : International Seed Testing Association.

LED : Light Emitting Diode ou DEL en français pour Diode électroluminescente.

RéGàTe : Réponse Germinative à la Température : Implications pour la gestion et la valorisation des ressources génétiques, la création variétale et la compétitivité sur le marché.

RGB : Red Green Blue, RVB en français pour Rouge Vert Bleu.

SNES : Station Nationale d'Essais de Semences.

URP3F : Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères.

Liste des annexes

Annexe I : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 10°C

Annexe II : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 15°C

Annexe III : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 21°C

Liste des illustrations

Tableau 1 : Principales caractéristiques des trois populations de ray-grass anglais étudiées **(p7)**.

Figure 1 : Présentation des trois populations de ray-grass anglais étudiées **(p7)**.

Figure 2 : Présentation des bancs de germination de type Jacobsen de la SNES **(p7)**.

Figure 3 : Présentation du plan de semis des six lots de ray-grass anglais semés à 10, 15, 21 et 26°C **(p8)**.

Figure 4 : Essai de viabilité au chlorure de tétrazolium des semences du lot ancien R1 **(p9)**.

Figure 5 : Protocole sur banc pour la segmentation des semences de ray-grass anglais, banc 4 – essai à 10°C **(p11)**.

Figure 6 : Etapes de segmentation des semences de ray-grass anglais pour les deux macros développées **(p12)**.

Figure 7 : Radicules émergentes des semences de ray-grass anglais, défauts de segmentation **(p13)**.

Figure 8 : Le déplacement des semences de ray-grass anglais comme indicateur de germination, un seuil fixé à 0,4mm **(p14)**.

Figure 9 : Contrôles et suivis des températures des bancs de germination n°2 et n°4 de la SNES **(p17)**.

Figure 10 : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 26°C **(p18)**.

Figure 11 : Courbes de germination cumulées des trois populations de ray-grass anglais **(p19)**.

Figure 12 : Vitesses moyennes, taux moyens de germination et taux de viabilité des populations de ray-grass anglais en fonction de la température **(p23)**.

Figure 13 : Comparaisons temporelles de la méthode automatique par rapport à la méthode visuelle **(p24)**.

Figure 14 : Courbes de germination cumulées lecteur et automatiques des lots récents de ray-grass anglais **(p25)**.

Figure 15 : Courbes de germination cumulées lecteur et automatiques des lots anciens de ray-grass anglais **(p26)**.

I. Introduction

I.1 – Les prairies, une biodiversité riche de plus en plus sollicitée par l’homme.

Recouvrant près de 40% des terres émergées, les prairies constituent l’un des écosystèmes les plus vastes du globe. Ces étendues sont dominées par une végétation herbacée, dont la majorité des individus appartiennent à la famille des Poacées (composée de plus de 7500 espèces). Le stade herbacé des prairies est entretenu par les feux, le broutage, les sècheresses et/ou les températures froides. La biodiversité de ces espaces est abondante, interconnectée et source d’une valeur agronomique, économique et écologique majeure, notamment pour l’homme (Lemaire, Wilkins & Hodgson 2005; Gaujour *et al.* 2012; O’Mara 2012). Les services rendus par les prairies sont en effet nombreux et de plus en plus sollicités, on pense à ce titre aux productions fourragères, à la création variétale, aux niches écologiques d’insectes pollinisateurs, à la séquestration du dioxyde de carbone atmosphérique (CO₂) ou encore aux aspects culturels et récréatifs comme les terrains de golf ou les parcs urbains (Gaujour *et al.* 2012).

I.2 – La germination, facteur clef de la valeur agro-économique et écologique d’une prairie.

La valeur d’usage d’une prairie, naturelle comme semée, est déterminée par (1) sa structure génétique (la diversité des espèces et variétés ainsi que leurs répartitions) et (2) par sa structure physique. Ces deux structures sont directement modulées par la qualité de la germination des espèces et variétés présentes (Gaujour *et al.* 2012; Derek Bewley *et al.* 2013; Ahmed 2015). Biologiquement, la germination d’une graine ou d’un grain est un processus physiologique complexe commençant par l’absorption d’eau (on parle d’imbibition) et s’achevant par l’émergence de tissus embryonnaires (en général la radicule), au travers de tissus protecteurs (le péricarpe et les téguments dans le cas des Poacées (Derek Bewley *et al.* 2013). L’imbibition « relance » le métabolisme suspendu des graines/grains entraînant notamment la respiration cellulaire, la réparation du génome, la consommation des ressources de l’albumen (Poacées) ou encore la synthèse protéique (Rajjou *et al.* 2012; Derek Bewley *et al.* 2013). Toutefois, dans la littérature scientifique, le terme germination est généralement employé afin de désigner l’émergence visible de la radicule, correspondant donc à l’étape de transition entre la germination sensu-stricto et la post-germination (Aquila 2009; Rajjou *et al.* 2012; Derek Bewley *et al.* 2013; Demilly *et al.* 2014; Ahmed 2015). Ce processus est modulé par l’expression (1) du génome de la graine/grain, (2) des conditions environnementales au cours du développement de la graine/grain

et des étapes post-récolte avant semis. La température est à ce titre, l'un des facteurs environnementaux impactant le plus la germination, jouant sur l'ensemble des étapes précédemment décrites (Dias *et al.* 2011; Derek Bewley *et al.* 2013; Hoyle *et al.* 2015).

I.3 – Le changement climatique menace la biodiversité et les services rendus par les prairies.

Amorcée pendant la révolution industrielle des années 1850, l'augmentation atmosphérique de la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) semble être la cause du changement climatique actuel dont l'une des conséquences principales, déjà observée, est l'augmentation de la température. Le phénomène s'intensifie, les modélisations climatiques actuelles prévoient en effet une augmentation moyenne mondiale de +1,1 à +4,8°C d'ici la fin du siècle (IPCC 2014). De récentes analyses ternissent encore plus ces prévisions, estimant à 5% la probabilité d'un réchauffement climatique inférieur à +2°C (Raftery *et al.* 2017). De par la complexité des mécanismes en jeu, de grandes incertitudes demeurent quant à la réponse des prairies face à ces prévisions. Quelle sera l'évolution de la biodiversité fragile de ces étendues et des services agro-économiques associés, faisant déjà l'objet d'1/4 des programmes mondiaux de conservation ? (Olesen & Bindi 2002).

I.4 – Les prairies face au changement climatique, le projet INRA CLIMAGIE.

Afin d'apporter des réponses à cette problématique, de 2011 à 2015, le projet CLIMAGIE (*Analyse et valorisation de stratégies agro-écologiques intra- et inter-spécifiques pour adapter les communautés prairiales au changement Climatique. Amélioration Génétique et Intensification Ecologique.*) porté par l'INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*), a réuni une vingtaine de chercheurs travaillant sur les différentes problématiques liées aux réponses agronomiques, physiologiques et biologiques des prairies, sauvages comme semées, face aux futures contraintes climatiques.

I.5 – L'INRA de Lusignan : températures et germination d'espèces prairiales sauvages.

La réponse germinative à la température des espèces prairiales représente donc un enjeu crucial dans l'adaptation de ce biome au changement climatique. C'est à l'équipe d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères de l'INRA de Lusignan, URP3F, encadrée par Abraham Escobar-Gutiérrez, qu'a été confiée cette thématique pour des variétés et populations sauvages française et du pourtour méditerranéen de trois espèces de graminées prairiales courantes (le ray-grass anglais : *Lolium*

perenne L., la fétuque élevée : *Festuca arundinacea* Schreb. et le dactyle pelotonné : *Dactylis glomerata* L.). L'ensemble des expériences ont été effectuées dans le cadre de la thèse de Lina Qadir Ahmed. Les suivis ont été réalisés dans des boîtes de Petri, pour des températures allant de 5 à 40°C avec un pas de 5°C. Pour ces trois espèces, les résultats ont montré la présence d'une forte variabilité inter- et intra-spécifique dans la réponse germinative à la température. En effet pour ces espèces/varieties les optimums de températures de germination varient entre +7,9 et +25,9°C. Des résultats ont en outre montré que certains lots de ray-grass anglais conservés depuis les années 90 au CRG (Centre de Ressources Génétiques des espèces fourragères et à gazons) de Lusignan avaient tendance à mieux germer aux températures basses. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat serait qu'au froid, les réparations cellulaires des semences les plus âgées auraient le temps de se produire puisque la germination est plus lente (Powell & Matthews 2012).

I.6 – Le ray-grass anglais, des fourrages aux gazons, une espèce majoritaire.

Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est une herbacée pérenne mondialement distribuée préférant les climats frais et tempérés. On retrouve cette plante en Amérique du Sud et du Nord, en Europe, ou encore dans certaines régions de l'Asie ou d'Australie. Sa température de développement optimale est en effet comprise entre 20 et 25°C. Le ray-grass anglais possède un port de feuilles dense et versé et est relativement robuste au piétinement. Très appétente pour les animaux d'élevages, elle présente en outre une excellente valeur alimentaire, une bonne digestibilité, une implantation facile ainsi qu'une longue souplesse d'exploitation. Toutes ces qualités font du ray-grass anglais l'une des herbacées les plus exploitées des zones agricoles tempérées, naturellement comme semée. Pour ses qualités structurelles, sa résistance et sa vitesse de développement, cette herbacée est également largement sélectionnée pour des usages récréatifs tels que les terrains de sports ou les parcs urbains (Ahmed 2015; Maciejewski, Osson & Laffineur 2015).

I.7 – Genèse et objectifs du projet RéGàTe.

Compte tenu de l'importance que représente le ray-grass, l'existence d'une forte variabilité génétique dans la réponse germinative à la température s'avère intéressante et pourrait être exploitée dans un objectif de création variétale, pour la production de fourrages ou l'établissement de gazons adaptés à certaines gammes de températures par exemple. En outre, le fait que la

température de germination optimale semble diminuer avec le vieillissement d'un lot de semences remet en question les méthodes actuelles de multiplication des lots âgés dans les centres de ressources génétiques. Pour ces centres, ces banques, les températures de multiplication correspondent en effet aux températures optimales des lots récents et sont pour la majorité des espèces comprises entre 20 et 30°C (21°C pour le ray-grass anglais au CRG de Lusignan) (Godefroid, Vyver & Vanderborght 2010; ISTA 2017a).

Afin d'explorer ces pistes et de poursuivre les travaux, le projet RéGàTe (*Réponse Germinative à la Température : Implications pour la gestion et la valorisation des ressources génétiques, la création variétale et la compétitivité sur le marché*) est proposé par l'INRA de Lusignan en partenariat avec l'ACVF (*Association des Créateurs de Variétés Fourragères*) le GEVES (*Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences*) et accepté en 2015, en réponse à l'appel à projets CASDAR « Semences et sélection végétale ».

Le projet RéGàTe a pour objectifs (1) de continuer d'explorer la diversité spécifique du ray-grass anglais et de la fétuque élevée dans la réponse germinative à la température, (2) d'automatiser l'acquisition des données de germination et (3) d'étudier les implications physiologiques/génétiques en jeu dans ces réponse germinatives à la température.

I.8 – La SNES, laboratoire de référence du GEVES pour les essais sur semences.

Le GEVES est un groupement d'intérêt public constitué par l'INRA, par le Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt et par le GNIS (*Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants*).

Le GEVES a pour objectif général d'assurer et de contrôler le bon fonctionnement de la filière semence sur le territoire français. Ses missions sont diverses : (1) évaluer et caractériser les nouvelles variétés végétales en vue de leur inscription au catalogue officiel français et de leur protection juridique, (2) contrôler la qualité et la conformité des semences et plants dans le cadre de leur certification, selon les règles ISTA, (3) dispenser des formations et animer un réseau français de laboratoires d'analyses de semences et (4) participer à la recherche et offrir une expertise.

La SNES (*Station Nationale d'Essais de Semences*) constitue l'un des trois secteurs d'activités du GEVES, située sur le site de Beaucouzé. La SNES est un laboratoire officiel d'expertise reconnu en France comme à l'étranger pour la qualité de ses mesures et essais sur semences. La SNES

effectue en routine des analyses variées et participe en outre quotidiennement à des activités de recherche et développement de méthodes sur semences, dont l'analyse d'image représente un volet important.

I.9 – L'analyse d'image à la SNES, un suivi fin des essais de germination.

L'analyse d'images correspond à l'extraction d'informations utiles, organisées et exploitables, généralement des mesures (taille, diamètre, temps...), à partir d'une ou plusieurs images brutes composées de pixels. Cette analyse est réalisée de manière manuelle ou automatique à l'aide d'algorithmes retravaillant les images par des filtres et/ou corrections successives (Gupta & Ibaraki 2014). Cet outil est particulièrement adapté aux mesures à haut débit non invasives réalisées en biologie expérimentale, souvent longues et répétitives (Demilly *et al.* 2014). Les images acquises permettent en outre de conserver une « preuve » des résultats à moindre coût. Poussée par des enjeux agro-économiques et écologiques, cette activité de recherche a le vent en poupe et de nombreuses techniques voient le jour dans le secteur public comme privé, de plus en plus adaptées aux problématiques précises comme le phénotypage sanitaire d'une plante ou encore le suivi précis de la germination des semences (Nilsson 1995; Dias *et al.* 2011; Belin *et al.* 2011; Demilly *et al.* 2014; Gupta & Ibaraki 2014).

L'analyse d'images appliquée aux essais de germination est développée à la SNES depuis 2001 sur les bancs de type Jacobsen. Cette méthode, déjà éprouvée au cours de nombreux projets de recherche permet actuellement de suivre finement la germination d'un lot de semences en continu, de façon précise et robuste et ce, indépendamment de contraintes horaires lorsque le suivi est assuré par des comptages manuels (Ducournau *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2011; Dias *et al.* 2011). Les données acquises sont en outre plus précises et robustes. En effet les mesures sont brèves et homogènes et de plus grands échantillons peuvent être analysés dans un même milieu dont les conditions environnementales principales sont finement contrôlées (de 800 à 2400 semences pour un même banc). Parmi la cinquantaine d'espèces pour lesquelles la méthode a été adaptée, les principaux essais concernent essentiellement les semences potagères ou de grande culture (Demilly *et al.* 2014).

I.10 – La SNES et le projet RéGàTe, problématiques et objectifs du stage.

L'INRA de Lusignan s'est donc tourné naturellement vers la SNES pour la prise en charge d'une partie des essais de germination proposés par le projet RéGàTe. Ces essais sont réalisés dans le cadre de mon stage de Master II.

Deux questions biologiques encadrent ainsi mes travaux :

1 – Existe-t-il une variabilité intra-spécifique dans la réponse germinative à la température chez le ray-grass anglais ?

2 – Le vieillissement d'un lot de semences, pour des populations sauvages de ray-grass anglais, entraîne-t-il une modification des températures optimales de germination ?

Les expériences ont été effectuées sur les bancs de germination de la SNES et les données acquises ont été traitées par analyse d'images. La SNES ne dispose toutefois pas encore d'une méthode automatisée d'analyse d'image spécifique au ray-grass anglais.

Un objectif majeur de mon stage consiste donc à :

Développer une méthode automatique de phénotypage germinatif, par analyse d'image sur les bancs de germination, pour les graminées dont le ray-grass anglais fait partie.

Après une présentation du matériel végétal et des bancs de germination, une première partie de ce mémoire sera consacrée au développement de la méthode d'analyses d'images. Par la suite, après avoir expliqué la démarche statistique effectuée, les données de germination issues du dépouillement humain des images acquises seront analysées et interprétées physiologiquement. Ces résultats seront enfin confrontés aux données acquises par la méthode développée afin de conclure quant à l'ajout du ray-grass anglais dans la liste des espèces analysables automatiquement par la SNES.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des trois populations de ray-grass anglais étudiées

Espèce	Année de production	Lieu de production	Poids de Mille Grains	Classe d'âge	Nom de Population	Nom de lot
Ray-grass anglais	1990	Département 65	2,267 g	Ancien	R1	RA
	2014	INRA Lusignan	1,598 g	Récent	R1	RB
	1991	Département 51	1,667 g	Ancien	R2	RC
	2014	INRA Lusignan	1,257 g	Récent	R2	RD
	1990	Département 25	1,711 g	Ancien	R3	RE
	2014	INRA Lusignan	1,720 g	Récent	R3	RF

Production ou collecte pour les lots anciens

Semences présentées côté paléole

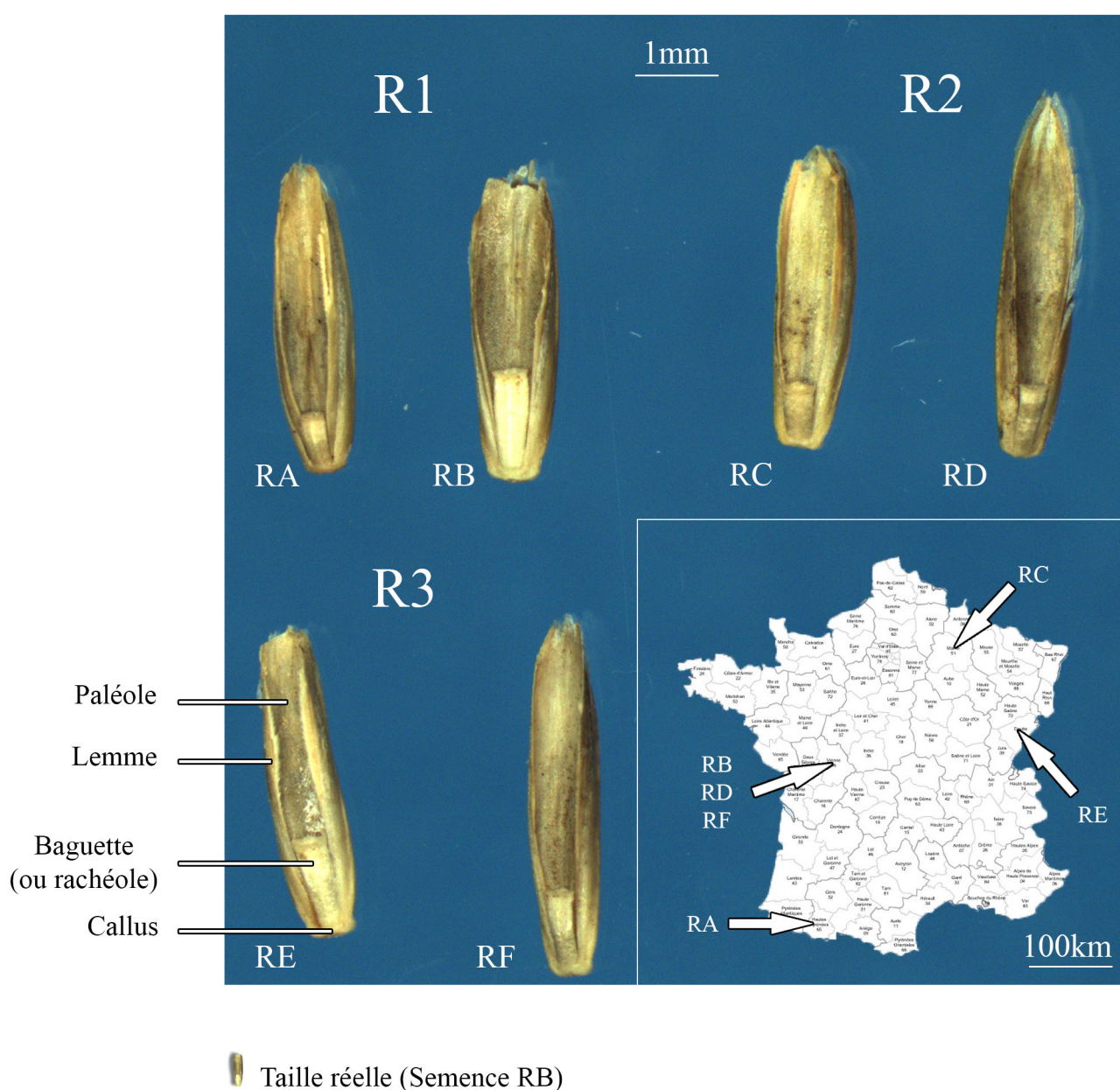


Figure 1 : Présentation des trois populations de ray-grass anglais étudiées
Photos prises à la loupe binoculaire numérique

II. Matériel biologique et technique

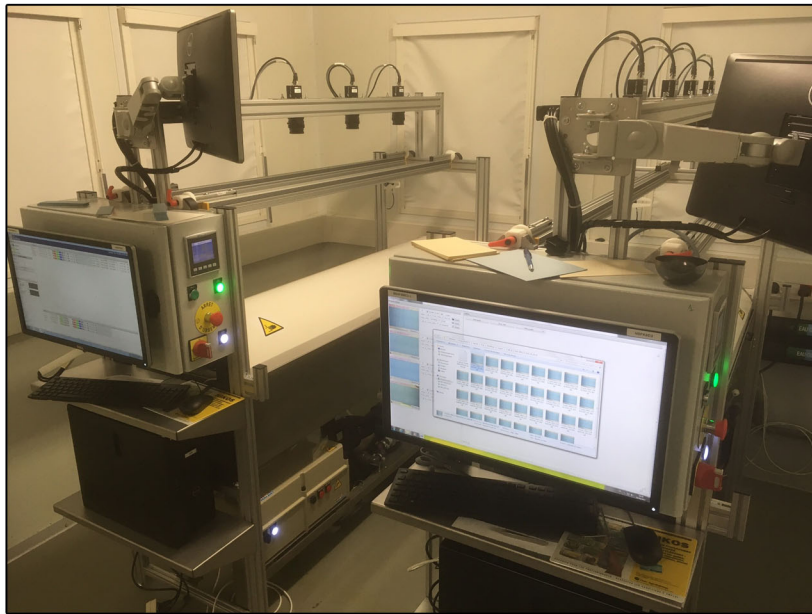
II.1 – Trois populations de ray-grass anglais étudiées sur deux lots, l'un collecté, l'autre multiplié au CRG (lots anciens et récents).

Est comparée la germination de trois populations sauvages de ray-grass anglais, nommées R1, R2 et R3. Comme le présentent le tableau 1 et la figure 1, chaque population est analysée sur lot ancien (RA pour R1, RC pour R2 et RE pour R3) et sur un lot récent (RB pour R1, RD pour R2 et RF pour R3). Deux lots anciens ont été collectés en 1990 [RA dans les Hautes-Pyrénées (65) et RE dans le Doubs (25)] et le lot RC en 1991 dans la Marne (51).

Afin de mettre en évidence les aspects génétiques dans la réponse germinative à la température, ces trois lots ont été multipliés en 2014 à l'INRA de Lusignan dans les mêmes conditions, en champ par 281 plantes parents afin de garantir la panmixie. Les trois lots produits en 2014 correspondent aux lots récents. Les 6 lots ont été conservés dans les mêmes conditions au CRG de Lusignan (5°C à sec).

II.2 – Les bancs de germination de type Jacobsen de la SNES.

Les semences sont semées et suivies sur les bancs de germination de la SNES (figure 2, au verso). La SNES dispose actuellement de 4 bancs de germinations de type Jacobsen, répartis dans deux modules climatiques. Les bancs de germination sont composés de (a) un bac rempli et alimenté en eau, dont la température est contrôlée, sous le bac, par (b) un système de refroidissement à l'eau glycolée et (c) par un système de chauffage par résistances électriques. Afin de d'améliorer l'homogénéité thermique, l'eau circule en circuit fermé dans le bac et la température du module climatique est également supervisée. Sur le bac, repose (d) une grille servant de support à (e) l'aqua-nappe sur laquelle sont déposés les papiers ou buvards de germination. Les bords de l'aqua-nappe trempent dans l'eau, assurant l'irrigation continue des buvards par capillarité. L'aqua-nappe peut être facilement remplacée en cas de contamination (champignons, bactéries) ou après une utilisation de plusieurs semaines. Sur le bac, (f) un capot assure une protection physique des essais et renforce l'homogénéité des conditions du banc (température, hygrométrie et obscurité). Ce capot se soulève à intervalles réguliers et permet aux quatre caméras de 5 MP (g) de prendre en photo les essais (spectre visible de la lumière). Lors de la prise de photos, toutes les 2 heures, les deux tubes LED, déplaçables, éclairent par flashes lumineux les essais (h) (4 flashes, un par caméra). Les bancs sont pilotés sur ordinateur par un programme développé par l'ESEO (Demilly *et al.* 2014).



Bancs de germination n°1 et n°2 - capots fermés

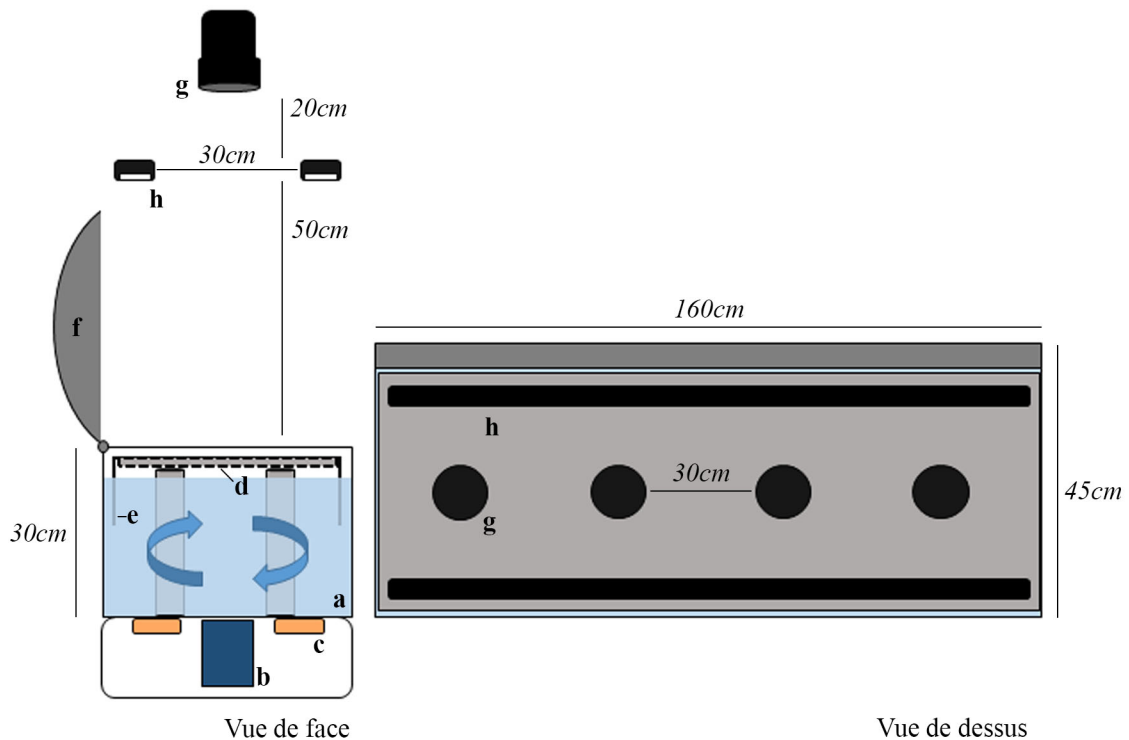
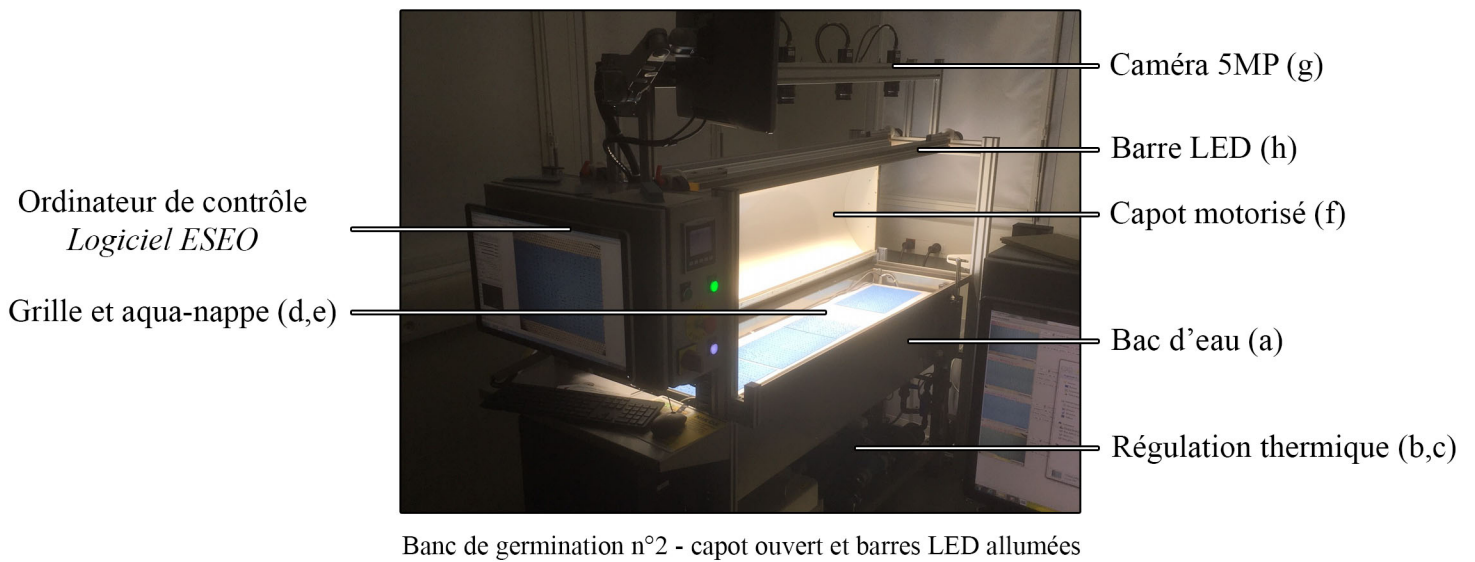


Figure 2 : Présentation des bancs de germination de type Jacobsen de la SNES

II.3 – Un semis manuel à 4 températures, directement sur bancs.

Les températures de germination des essais sont celles prévues par le projet RéGàTe : 10, 15, 21 et 26°C.

Pour chaque essai, 200 semences de chaque lot sont semées en 4 répétitions de 50.

Idéalement, les semences sont déposées sur les buvards secs, disposés par la suite sur les bancs afin de ne pas décaler leurs temps d'imbibition. Cette opération n'est cependant pas envisageable car, (1) les semences roulent sur les buvards secs et (2) les buvards déposés sur le banc doivent être aspergés d'eau afin d'éviter l'apparition de marques. Les semences sont alors semées à la pince directement sur les buvards, découpés (17x11cm) et disposés quelques heures auparavant sur l'aqua-nappe. Le temps de semis est d'environ 1h30 par banc, inférieur au pas de temps d'acquisition des images (2h). Avant chaque semis, le matériel utilisé est désinfecté et la qualité de l'aqua-nappe inspectée (intégrité physique, sanitaire).

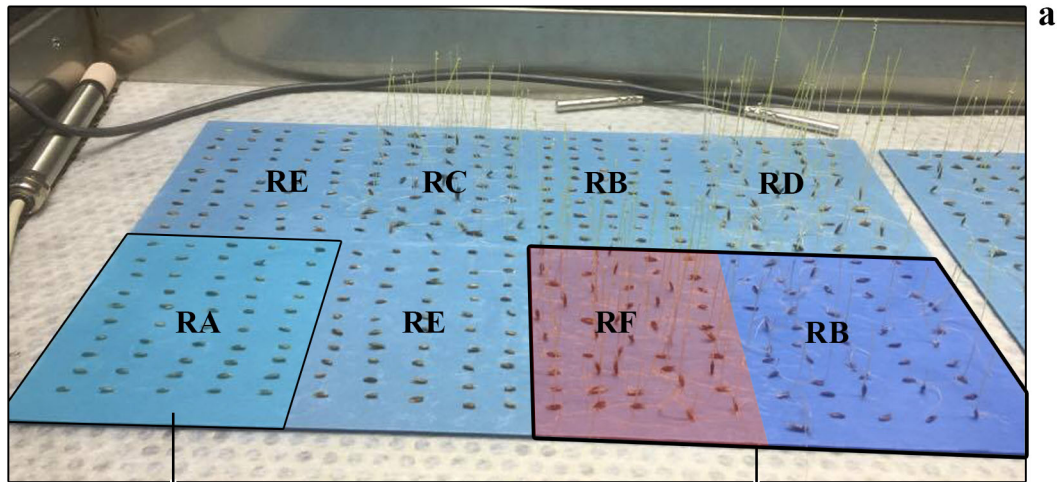
Pour les graminées il est possible de suivre 100 semences par buvards découpés. Sous chaque caméra il est possible d'accoler 4 buvards découpés. Nous semons donc 8 répétitions par caméra (400 semences), pour une surface de semis de 34x22 cm.

Comme le présente la figure 3, les premiers tests ayant montré une très forte hétérogénéité dans la vitesse de germination des lots anciens et récents (a), les lots ont donc été regroupés par âge sur un même buvard afin de faciliter l'analyse d'images ultérieure. On notera tout de même que, pour chaque lot, les répétitions sont réparties sur l'ensemble du banc. Pour chaque température, 3 des 4 caméras du banc sont utilisées (b). Afin de rentabiliser le fonctionnement des bancs, la dernière caméra sert pour d'autres essais menés à la même température (autres espèces, tests optiques...). Les essais à 15°C, 21°C et 26°C ont été réalisés sur le banc de germination n°2. L'essai à 10°C a été réalisé sur le banc n°4.

II.4 – Le semis à 26°C du lot récent R2, contrôle biologique de l'homogénéité des bancs.

De 10 à 21°C, le lot récent R2 est celui présentant le plus de variabilité. Il semble donc être le plus approprié pour mettre en évidence un effet éventuel de la position (caméra ou banc) sur la germination. Pour l'essai à 26°C, le dernier réalisé, nous décidons donc de semer sous chaque caméra des bancs n°1 et n°2, 50 semences du lot récent R2 (8 répétitions).

Banc n°2 - Zone de la caméra n°1 - semis du ray-grass anglais à 21°C - 5ème jour



Une répétition

Un buvard découpé (17x11cm)



b

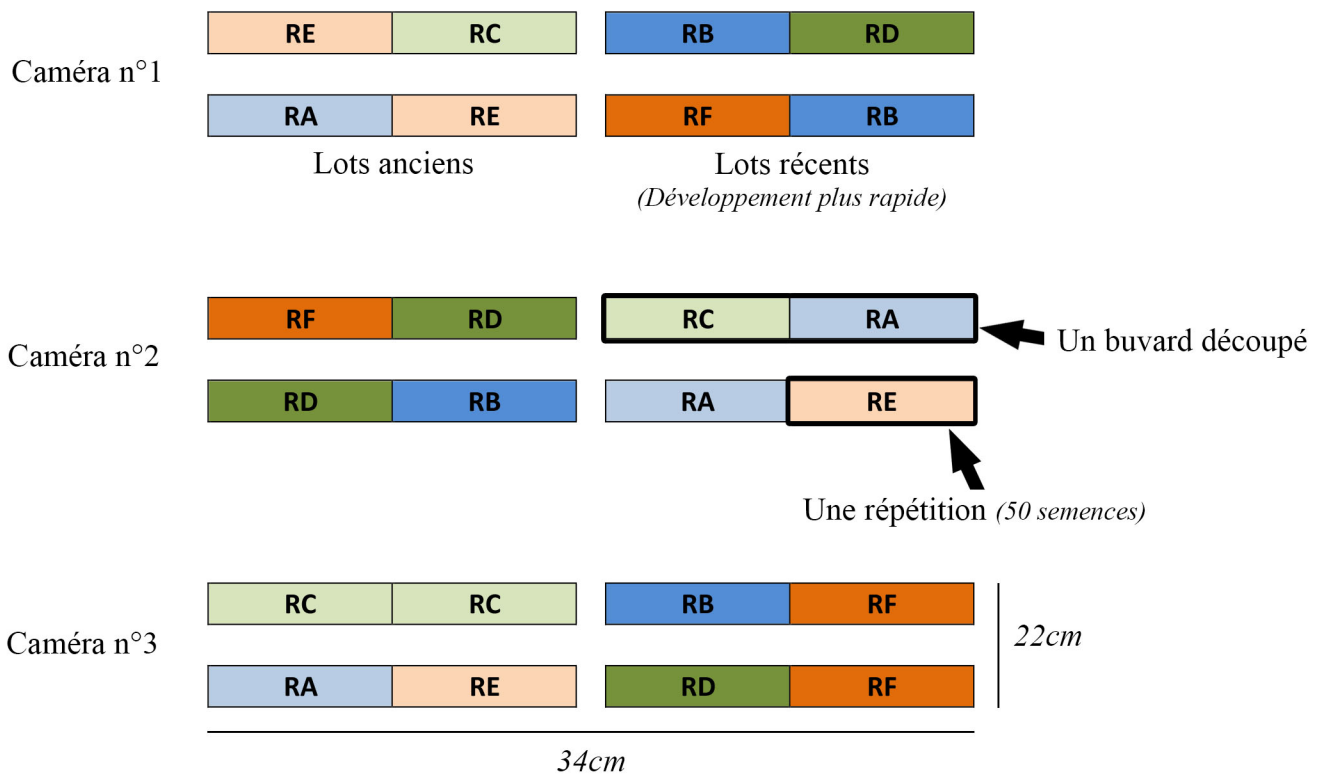


Figure 3 : Présentation du plan de semis des six lots de ray-grass anglais semés à 10, 15, 21 et 26°C
Photo d'illustration de la zone caméra n°1 pour l'essai à 21°C

II.5 – Du mois à la semaine, la durée des essais initiaux diminue avec la température.

La durée de chaque essai est déterminée par (1) les travaux réalisés au cours de la thèse de Lina Q. A., (2) l'expérience de la SNES et (3) l'inspection journalière des bancs. De 26 à 10°C le temps de suivi augmente ainsi de plus ou moins une semaine. Environ une semaine pour les essais à 26°C et un mois pour ceux à 10°C.

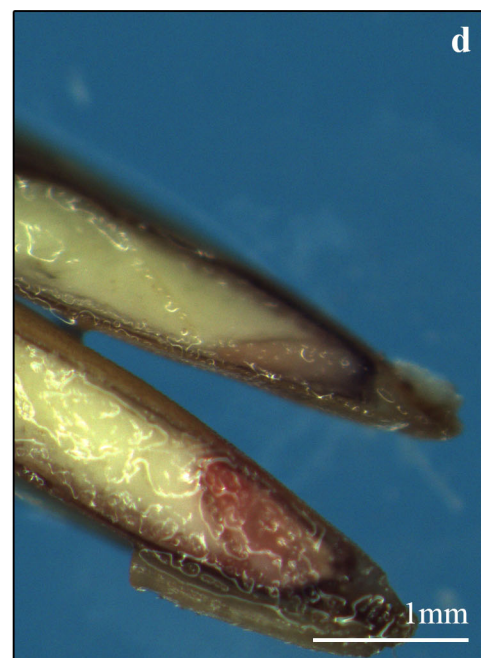
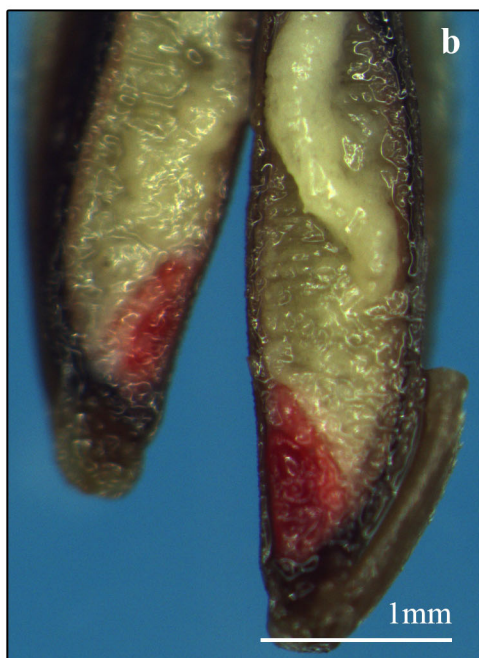
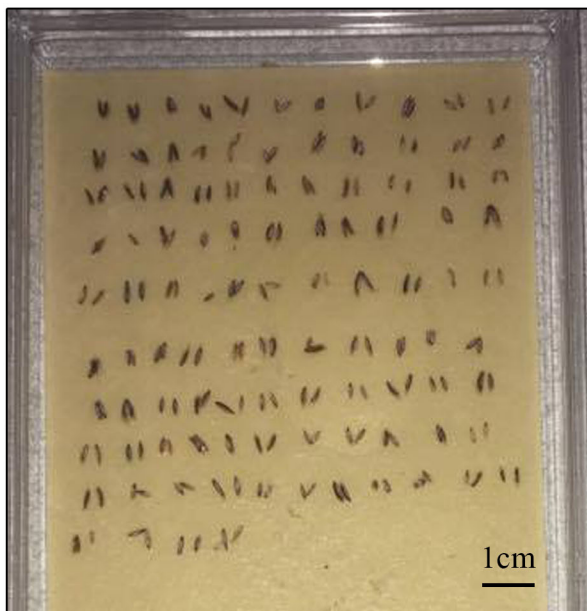
II.6 – Le développement plus lent des lots anciens implique un prolongement des essais initiaux.

Malgré le plan de semis, les racines et parties aériennes des lots récents finissent par envahir les lots voisins anciens, gênant l'acquisition des données. Pour chaque température, les essais sont donc prolongés, après que les semences germées aient été retirées. Pour les essais réalisés à 15, 21 et 26°C les essais sont prolongés directement sur le banc n°2. Pour l'essai à 10°C, le banc n°4 ayant été réservé par la SNES pour un autre projet, les essais sont prolongés en boîtes en module climatique. Les essais sont prolongés jusqu'à l'obtention d'un plateau de germination et/ou jusqu'à ce que la mort des semences restantes soit clairement identifiable (suintement, développement de bactéries et/ou de champignons).

Pour chaque essai il faut ainsi compter 1 à 2 semaines de prolongation.

II.7 – Contrôle de la viabilité des semences au chlorure de tétrazolium.

Un contrôle de viabilité des semences est réalisé pour 200 semences des lots dont le taux de germination maximum ne dépasse pas 95%, pour au moins une température testée. Nécessaire à l'interprétation des résultats, ce test facilite en outre le choix d'arrêter ou non les essais de prolongations. Après avoir été immergées 3h dans l'eau à 20°C, les semences sont fendues longitudinalement et à nouveau immergées 2 heures dans une solution aqueuse de chlorure-2,3,5-triphényl tétrazolium de pH 6,5-7,5 (chlorure de tétrazolium) à l'obscurité et à 30°C. Incolore et soluble, le chlorure de tétrazolium est réduit lors de la respiration par les déshydrogénases des tissus embryonnaires vivants. Il se transforme alors en formazan et devient rouge et insoluble (Slater, Sawyer & Sträuli 1963; Mosmann 1983; ISTA 2017b). Sont ainsi discriminés visuellement les embryons vivants des embryons morts. Compte tenu de mon expérience et de la taille des embryons, il est parfois difficile de trancher quant à la viabilité ou non d'un embryon (figure 4). Le taux de germination déterminé au chlorure de tétrazolium représente donc une estimation plus qu'une valeur absolue.



Semences de ray grass-anglais du lot ancien R1,
(a, b) embryons vivants, (c) embryon mort, (d) ambiguïté quant à l'état de l'embryon

Figure 4 : Essai de viabilité au chlorure de tétrazolium des semences du lot ancien R1
Photos a,b,c et d prises à la loupe binoculaire numérique

III. Développement de la méthode d'analyse d'images

III.1 – L'acquisition automatique des données de germination par analyse d'images.

Dans les parties suivantes seront présentés les travaux réalisés, relatifs à l'enjeu technique du stage, à savoir la mise au point d'une méthode d'acquisition automatique des données de germination pour le ray-grass anglais. L'analyse d'image représentant de réels enjeux scientifiques et économiques pour la SNES, une description de la méthode et du raisonnement appliqué sera préférée à la présentation détaillée des algorithmes.

III.2 – L'analyse d'image réalisée sous le logiciel libre Image J II, développement de macros.

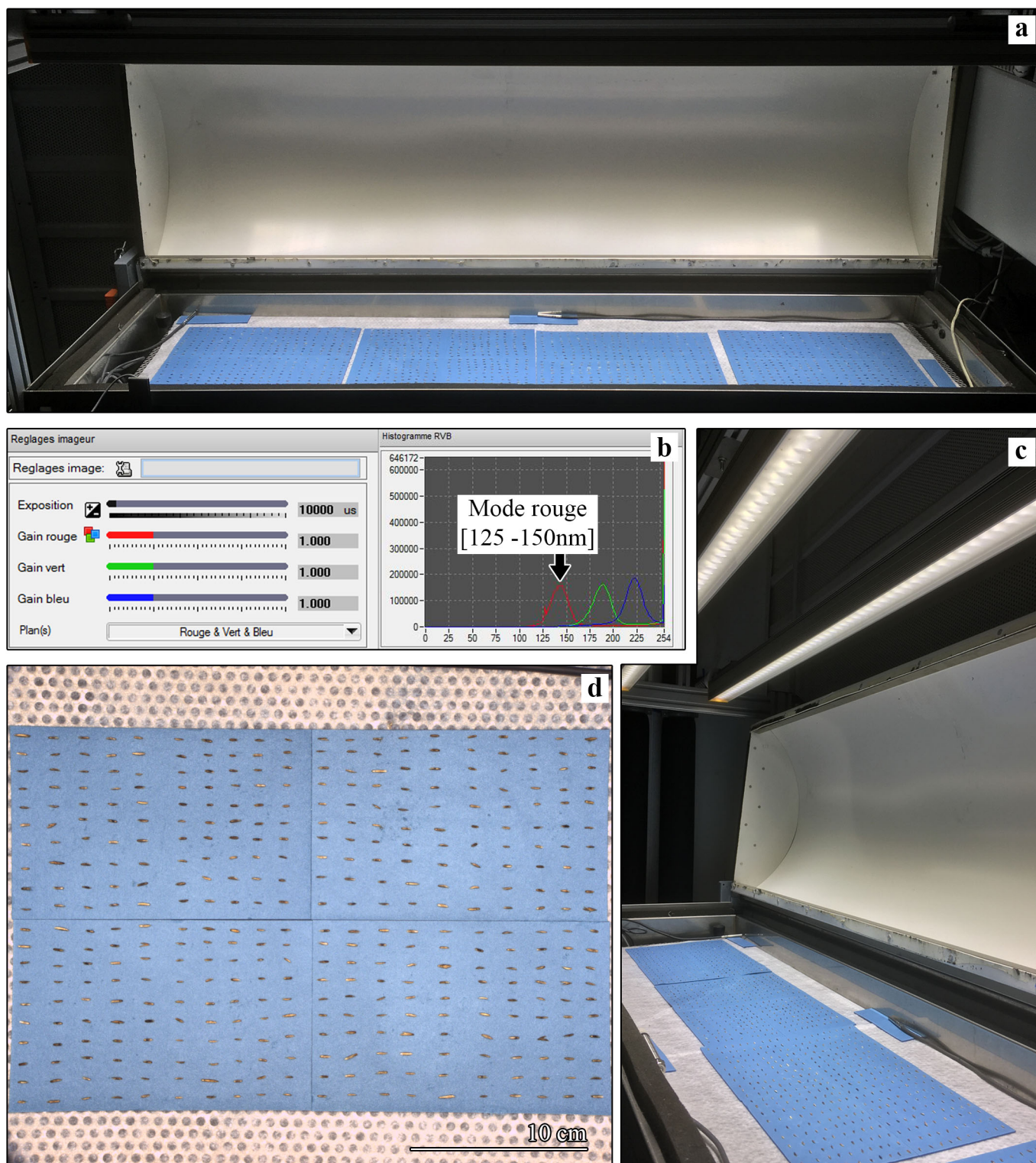
Pour chaque essai, la séquence d'images prises par les caméras d'un banc est analysée à l'aide du logiciel libre de traitement d'images Image J II (version 1.51h) et de son extension FIJI, facilitant la création de macros et adaptée aux analyses biologiques (Schindelin *et al.* 2012; Demilly *et al.* 2014). Une macro correspond à une suite d'instructions, codées dans un langage informatique lu par le programme qui les exploite (ici, IJ1 Macro). Ces macros permettent ainsi d'effectuer automatiquement une suite de traitement/analyses sur une ou plusieurs images (Gupta & Ibaraki 2014).

III.3 – La macro générale développée par Didier Demilly : 'Germination'.

Didier Demilly développe à la SNES une macro générale nommée « Germination ». Cette macro permet d'effectuer l'ensemble des opérations nécessaires au traitement des séries d'images acquises sur les bancs de germination (Demilly *et al.* 2014).

Découper les séries d'images, une étape anodine mais puissante.

A la fin d'un essai, la première étape consiste à découper les séries d'images obtenues afin de supprimer les éventuels bords inutiles. Cette action permet (1) de réduire nettement le poids informatique des séries d'images et (2) de gagner en qualité d'analyse (rapidité, précision). Une fonction permet en outre de découper la même série d'images en deux parties, ce qui peut s'avérer très utile si un défaut d'image est présent sur une partie de la série (ombre, reflet...).



(a) disposition des buvards sur le banc, (b) réglages optiques des caméras du banc,
 (c) position des barres LED du banc, (d) zoom et mise au point des caméras pour le ray-grass anglais

Figure 5 : Protocole sur banc pour la segmentation des semences de ray-grass anglais, banc 4 - essai à 10°C
Captures d'écrans du logiciel de pilotage des bancs (c) et image de la caméra 2 du banc (b)

La segmentation des semences et radicules, clef de l'analyse de germination.

La qualité des analyses et le bon fonctionnement de la macro « Germination » dépendent directement de la qualité de segmentation des semences et/ou de leurs radicules. La segmentation des semences et/ou des radicules est assurée par des macros spécifiques de segmentation, exploitées par la macro générale. La segmentation d'une image correspond à la séparation des pixels en groupes distincts (Gupta & Ibaraki 2014). La segmentation des semences correspond donc à la séparation nette des pixels appartenant aux semences des pixels appartenant au papier de germination. En général, la qualité de la segmentation d'une semence dépend de la qualité de son contraste avec le substrat/fond. L'objectif consiste donc dans un premier temps à développer une macro de segmentation propre aux semences de ray-grass anglais.

III.4 – L'objectif technique : segmenter les semences de ray-grass anglais.

Les réglages physiques

Les différents réglages physiques réalisés sur le banc impactent directement le contraste semences / buvards et donc la qualité de leurs segmentations. Pour améliorer le contraste nous pouvons jouer sur (1) l'éclairage (sa durée, son intensité et sa position), (2) le type de papier de germination utilisé (sa couleur, son grain, son épaisseur...), (3) le type de semis (la densité, l'orientation des semences...) et (4) les réglages optiques (zoom, mise au point et temps d'exposition et ouverture). Cette étape de mise au point est longue. Il faut en effet, après chaque réglage, suivre la germination de quelques semences pour avoir une idée de la qualité des images obtenues et de leur segmentation. En outre il ne suffit pas d'obtenir une image nette et précise des semences pour garantir une bonne segmentation. Enfin, il faut également garder en tête que ces réglages ne doivent pas être trop compliqués, exigeants ou chers afin de permettre l'utilisation à haut débit de la méthode développée.

La figure 5 présente les réglages optimums retenus parmi tous ceux qui ont été testés :

- Utilisation d'un papier de germination bleu marine (*Référence fournisseur : 10-3425-80 / GE HEALTHCARE Life Sciences*). (a)
- Disposition des semences : longueur des semences parallèle à la longueur du banc. (d)
- Semis, zoom et mise au point pour 400 semences / champ de caméra. (4 buvards de 17x11cm soit une surface totale de 34x22cm par champ de caméra). (b)

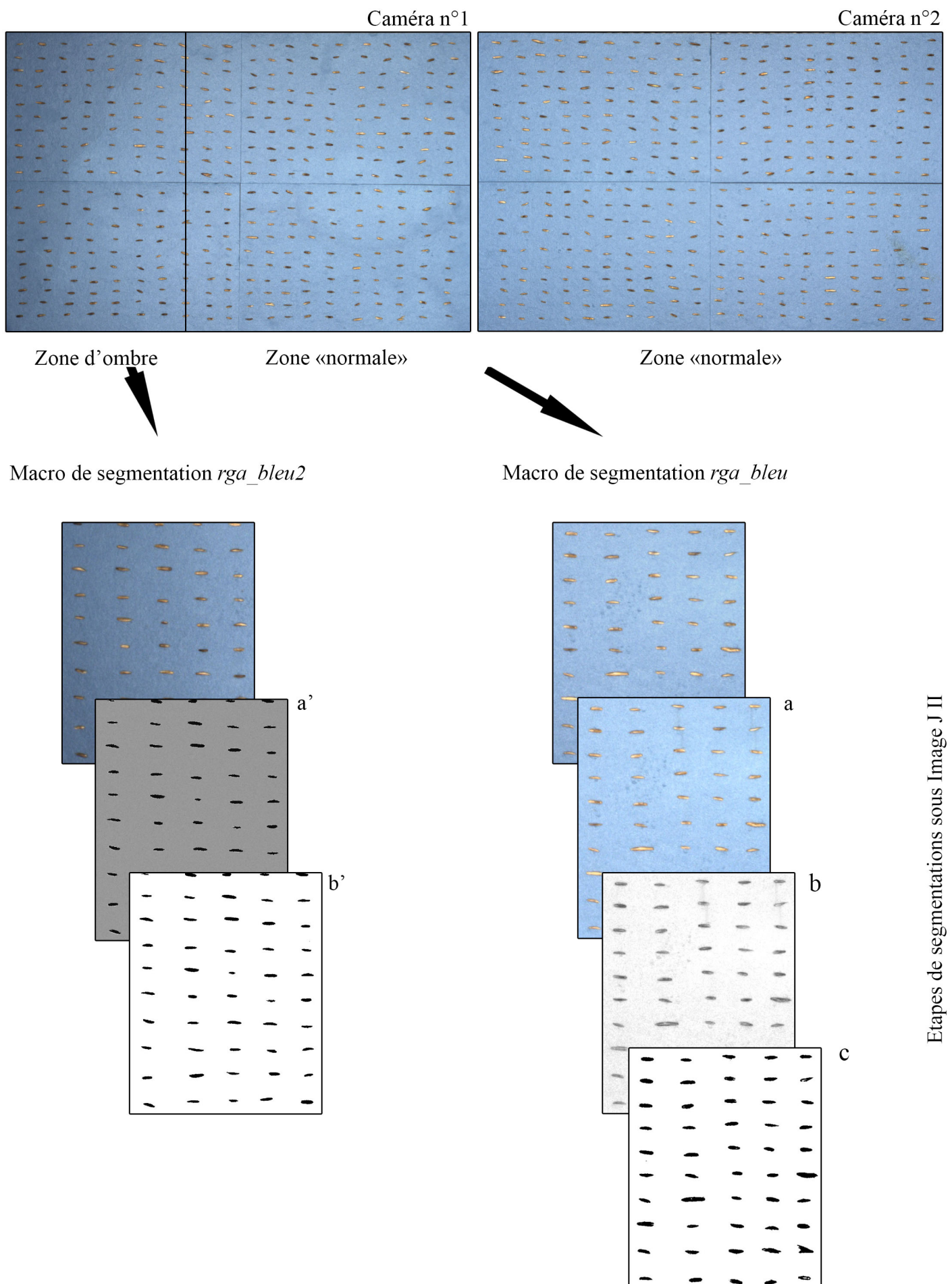


Figure 6 : Etapes de segmentations des semences de ray-grass anglais pour les deux macros développées
Photos par caméras du banc de germination n°2 et traitements des images sous Image J II

- Canaux RGB, temps d'exposition de 10 ms et ouverture réglée sur le mode rouge comprise entre [125 et 150 nm]. (b)
- Flashs classiques 'de base' au moment des photos à l'aide des deux barres LED, face aux semences. (c)

Deux macros de segmentation pour deux qualités d'images.

En parallèle des réglages sur banc, de nombreux essais de traitements d'images sont effectués sur les séries obtenues afin d'obtenir la meilleure segmentation possible des semences.

Les semences ont été semées jusqu'aux extrémités des bancs de manière à avoir un débit suffisant de phénotypage. Du fait du système d'éclairage et de la structure des bancs, une légère zone d'ombre recouvre les semences proches des deux extrémités (figure 6). La première macro de segmentation développée au cours du stage fonctionne mal pour ces zones. Les zones « normales » ont donc été séparées des zones « ombragées » afin de développer et d'appliquer une deuxième macro de segmentation spécifique. Les étapes retenues pour la segmentation des semences sont :

Pour la macro classique, nommée rga_bleu :

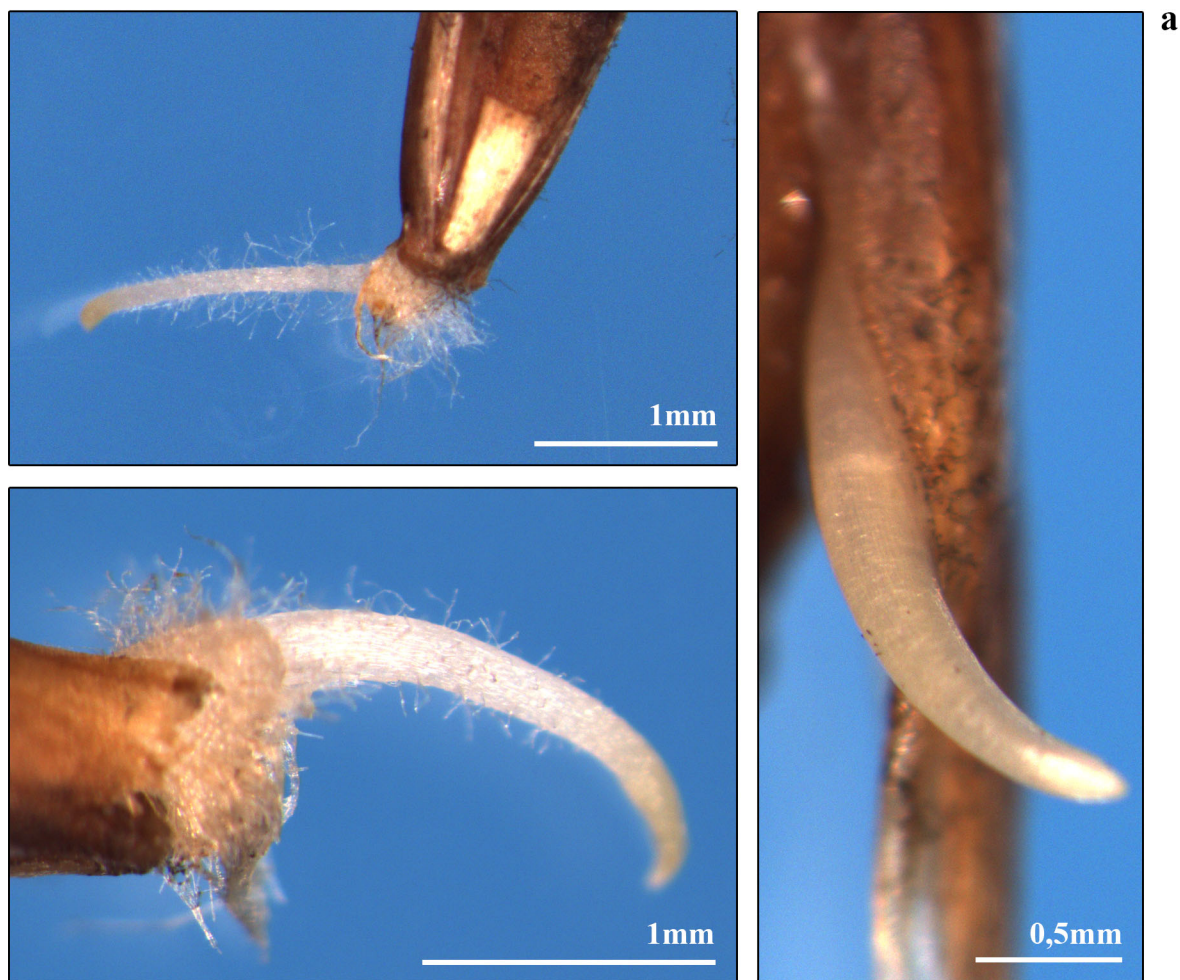
- (a) Lisser le fond par un tampon de diamètre 50 pixels.
- (b) Sélectionner et isoler le canal bleu.
- (c) Seuil par défaut de séparation des pixels en deux classes (blancs et noirs).

Pour la macro traitant les zones ombragées, nommée rga_bleu2 :

- (a') Convertir et décomposer l'image en HSB et isoler le canal H (hue, saturation and brightness).
- (b') Seuil par défaut de séparation des pixels en deux classes (blancs et noirs).

III.5 – Création de la grille, traiter les semences individuellement.

La deuxième étape consiste à « déterminer une grille ». La grille correspond à une zone orthogonale délimitée autour de chaque semence segmentée sur les séries d'images. Cette grille permet d'isoler les semences les unes des autres et de les étiqueter, en fonction de leurs positions et du plan de semis. Chaque semence est ainsi repérée et traitée individuellement par la macro



Radicules émergentes des semences de ray-grass anglais fines et translucides (lot RD)

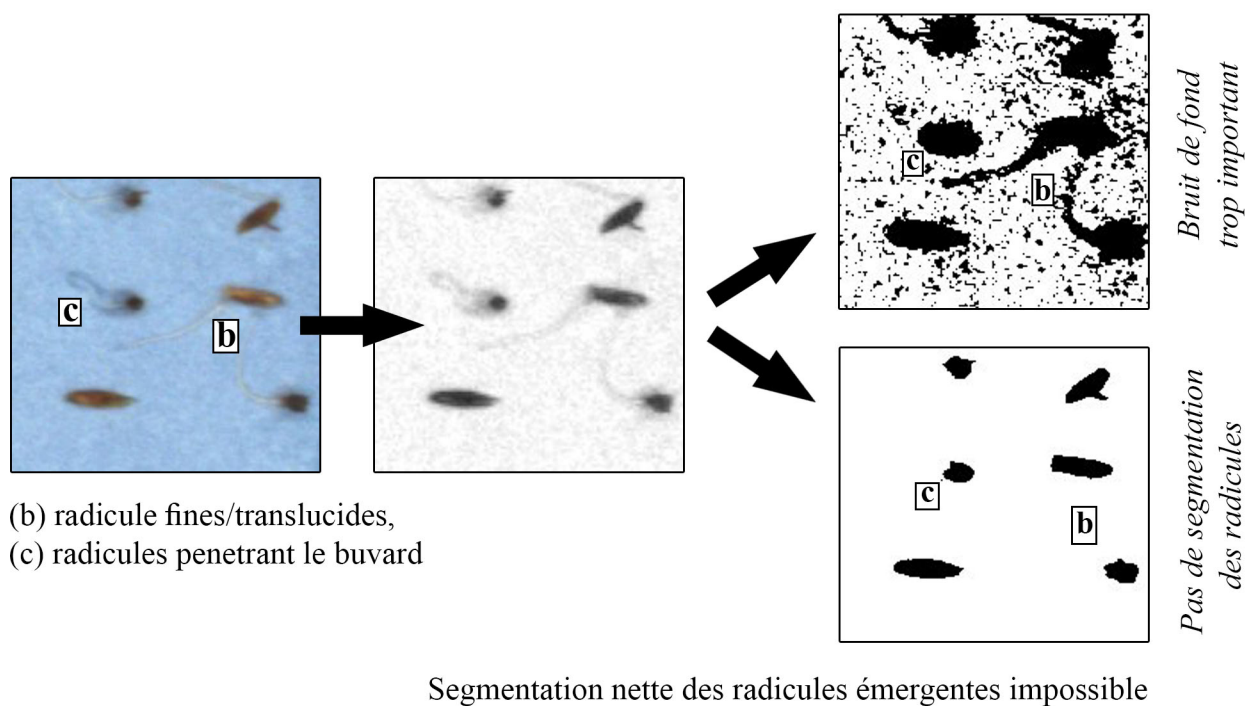


Figure 7 : Radicules émergentes des semences de ray-grass anglais, défauts de segmentation
Photos prises à la loupe binoculaire numérique (a) et traitées sous Image J II (b,c)

« Germination ». On notera toutefois que la grille peut être déterminée/modifiée manuellement, ce qui peut s'avérer très utile lorsque la segmentation de quelques semences est impossible.

III.6 – Deux variables pour déterminer l'image de germination d'une semence.

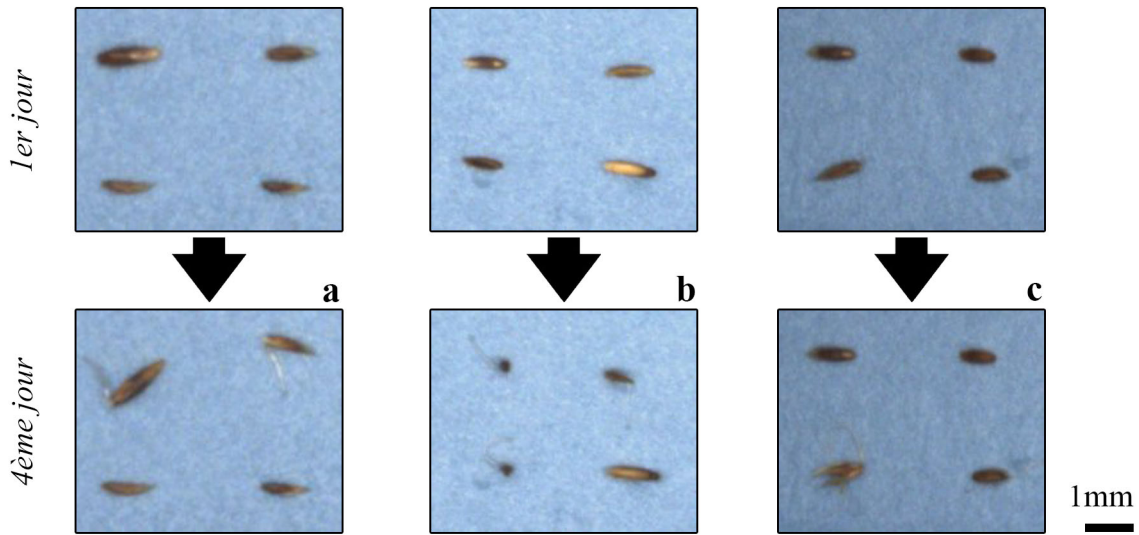
La segmentation de la radicule translucide impossible.

Si la bonne segmentation des semences de ray-grass anglais ne pose pas vraiment de problèmes, celle des radicules émergentes s'avère impossible (*Dans le cadre du projet RéGàTe, une longueur de 2mm de la jeune racine/radicule est retenue comme signal de germination*). Les radicules sont en effet translucides, très fines ($< 0,5\text{mm}$) et capables de pénétrer le papier de germination, comme le montre la figure 7 (a). Deux problèmes principaux sont alors rencontrés, (b) les radicules sont partiellement segmentées et les corrections nécessaires entraînent l'apparition d'un important bruit de fond perturbant le fonctionnement de la macro générale et (c) certaines radicules pénètrent les fibres du papier de germination et rendant leur segmentation impossible.

L'alternative : le déplacement de la semence comme indicateur de germination.

Suite aux premiers essais nous avons toutefois remarqué que le développement de la radicule entraîne quasi-systématiquement, chez le ray-grass anglais, un léger déplacement de la semence (figure 8). Trois cas sont observés : (a) la semence est déplacée sur le côté, (b) la semence se redresse et plus rarement (c) les glumelles s'ouvrent. Nous décidons ainsi, pour pallier au problème de segmentation de la radicule, d'utiliser le déplacement de la semence comme indicateur de sa germination. La semence étant correctement segmentée par les macros développées (*rga_bleu* et *rga_bleu2*), la macro générale « Germination » est capable de calculer un centre d'inertie pour chaque semence et d'en déterminer ses coordonnées spatiales 2D (X et Y). Pour une semence, l'évolution de ces coordonnées nous renseigne donc sur son déplacement au cours du temps.

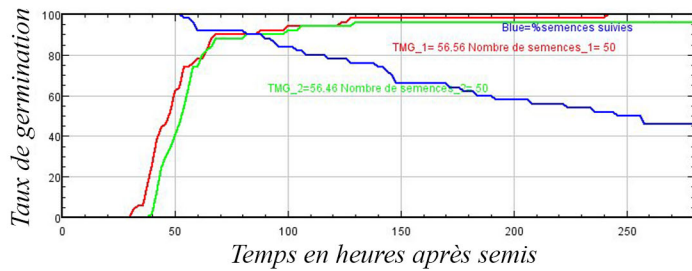
Deux nouveaux problèmes se posent quant à l'utilisation du déplacement du centre d'inertie des semences comme indicateur de germination. Premièrement, pour une semence, la segmentation peut différer de quelques pixels d'une image à l'autre sans pour autant que la semence n'ait changé de position. En outre, l'imbibition de la semence entraîne une légère évolution de sa forme par un « gonflement » qui n'est pas parfaitement symétrique, et donc de la position de son centre d'inertie. Le centre d'inertie calculé à partir de la segmentation évolue donc tout au long de la série d'images.



La germination des semences de ray-grass anglais entraine leurs déplacements

Germinations déterminées visuellement

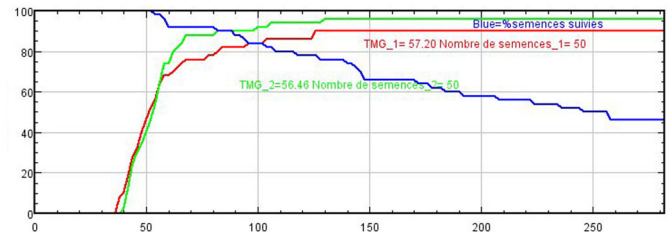
Germinations déterminées automatiquement



Temps en heures après semis

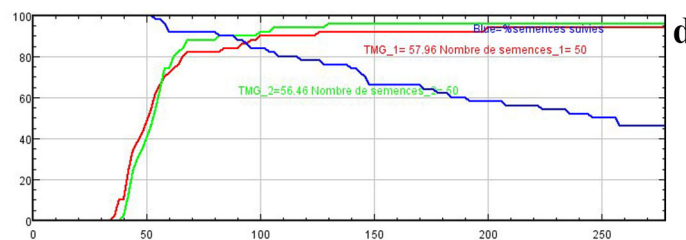
Seuil de déplacement du centre d'inertie des semences fixé à 0,2mm

Germination sur-estimée



Seuil de déplacement fixé à 0,6mm

Germination sous-estimée

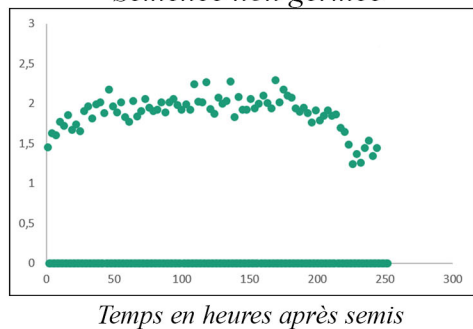


Seuil de déplacement fixé à 0,4mm

Meilleur compromis actuel

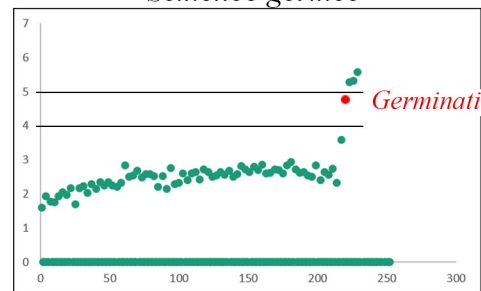
Déplacement du centre d'inertie
(mm * 10⁻¹)

Semence non germée



e

Semence germée



f

Germination correspondant à un déplacement
du centre d'inertie de la semence]0,4 et 0,5mm[

Figure 8 : Le déplacement des semences de ray-grass anglais comme indicateur de germination, un seuil fixé à 0,4mm

Photos (a,b et c) prises par les caméras du banc de germination n°2

Il convient alors (1) de déterminer le temps ou l'image à partir de laquelle l'imbibition est terminée et (2) de déterminer un seuil de déplacement du centre d'inertie des semences, par rapport à cette image de référence, permettant de discriminer les semences germées des non germées.

L'image de référence

Idéalement l'image de référence correspond donc à l'image précédant celle de la première germination observée. Faisable dans le cadre d'un stage, examiner toutes les acquisitions semences à semences n'est pas envisageable à haut débit en routine. L'image de référence doit donc être déterminée avec suffisamment de marge pour s'appliquer dans la plupart des essais. Ainsi, pour les essais à 10 et à 15°C la 20^{ème} image (soit 40 heures après semis) semble appropriée comme référence. Pour les essais à 21 et 26°C c'est la 10^{ème} image (20 heures après semis) qui semble appropriée.

Le déplacement du centre d'inertie des semences : un seuil indicateur de germination fixé à 0,4mm.

La macro générale permet d'ajuster le seuil de déplacement du centre d'inertie de la semence (figure 8). En vert, la courbe correspond aux données visuelles et en rouge celle correspondant aux données automatiques variables selon la valeur du seuil de déplacement fixé. Le seuil de déplacement retenu du centre d'inertie est de 0,4mm par rapport au centre d'inertie calculé pour l'image de référence (d). L'observation du déplacement du centre d'inertie des semences au cours du temps permet en outre de confirmer cette valeur. La figure 8 présente également deux cas, le déplacement du centre d'inertie par rapport à l'image de référence d'une semence non germée compris entre [0,1 et 0,25mm] (e) et celui d'une semence germée pour laquelle le déplacement du centre d'inertie au moment de la germination est compris entre]0,4 et 0,5mm[(f).

Faux négatifs et positifs, quand les semences quittent leurs « cases ».

Lorsqu'une semence se déplace hors de sa zone préalablement définie sur la grille, il arrive qu'elle soit segmentée à cheval sur un trait de la grille. Dans ce cas, les zones adjacentes ne sont plus prises en compte par l'ordinateur. Cette fonction de la macro générale permet de réduire le nombre de faux positifs en évitant de considérer que le débordement d'une semence A sur la case d'une semence B corresponde au signal de germination de la semence B.

III.7 – Le traitement des données.

Ajustement et contrôle de l'automatisation par comptage visuel, les données lecteur.

Afin d'ajuster et pour contrôler le fonctionnement de la méthode automatique, la macro générale permet également de faire défiler, image par image, les séries acquises sur les bancs afin de déterminer visuellement l'image de germination de chaque semence. Au total, nous disposons donc de 3 types de données :

- Les données correspondant aux comptages visuels faits sur les images pour les essais non prolongés, on parlera de données lecteur (1).
- Les données correspondant aux comptages visuels faits sur les images pour les essais non prolongés **et** prolongés, on parlera de données prolongées (2).
- Les données correspondant aux comptages automatiques faits sur les images pour les essais non prolongés, on parlera de données automatiques (3).

Pour les comptages lecteur, afin de se rapprocher des exigences RéGàTe, l'émergence d'une racine d'environ 2mm est retenue comme signal de germination. L'analyse d'image automatique n'est pas réalisable sur les essais prolongés car la disposition des semences ne correspond plus à une matrice rectangulaire nécessaire au fonctionnement de la macro générale (les semences germées ayant été retirées).

L'analyse des données prolongées (2), pour lesquelles le temps n'est pas un facteur limitant, servira à répondre le plus précisément possible aux problématiques biologiques engagées par le programme RéGàTe. La comparaison des données lecteur (1) et automatique (3) servira quant à elle, à évaluer le fonctionnement de la macro développée au cours du stage.

Comparaisons statistiques, des analyses classiques au test du log-rank.

Les analyses statistiques effectuées et discutées dans ce rapport sont réalisées pas à pas à l'aide du logiciel libre R (*R Development Core Team (2014)*) et de son extension R Studio (*R studio Team (2016)*). Une vérification générale est également effectuée à l'aide du logiciel SAS®.

Les conditions d'application de tests paramétriques ne sont pas vérifiées pour mes données de germination, (1) plans de semis non aléatoires, (2) distribution non normale des résidus des modèles construits (même après transformations des données le test de Shapiro donne une p-valeur

< 2°-16), (3) non indépendance des répétitions et (4) données censurées. Les données censurées correspondent aux données pour lesquelles la mesure n'est pas « précise » : dans notre cas, les données sont acquises toutes les 2h. Il n'est donc pas possible de classer les semences déclarées germées pour une même image (McNair, Sunkara & Frobish 2012). En outre il n'est pas possible de savoir si une semence non germée est morte ou si son temps de germination est supérieur à la durée de l'essai. La variance du temps de germination moyen des lots n'est donc pas précisément calculable (McNair *et al.* 2012). *Notons tout de même que ce doute concerne une faible partie des semences, la plupart des non germées étant clairement mortes et les taux potentiels ayant été évalués au tétrazolium.*

Ainsi, compte tenu des remarques précédentes, de l'avis de mes encadrants, des échanges entretenus au cours de mon stage avec Gilles Hunault (*Enseignant-chercheur à l'université d'Angers en mathématiques appliquées*) et des deux revues scientifiques relatives aux analyses statistiques sur des données de germination (McNair *et al.* 2012; Sileshi 2012), la comparaison de données est effectuée à l'aide de tests non paramétriques. Au regard de la taille importante des effectifs comparés, je reste néanmoins confiant quant à la puissance de ces tests non paramétriques (Poinsot 2004).

Le taux de germination (TG) est une des variables les plus utilisées pour comparer différents lots de semences (McNair *et al.* 2012; Sileshi 2012; Demilly *et al.* 2014). Ce critère est en outre crucial dans les problématiques de conservation des ressources génétiques (Godefroid *et al.* 2010). Le taux de germination est donc un critère de comparaison prioritaire dans ce rapport. Pour comparer les différents taux entre eux, des tests de X^2 d'homogénéité généraux ont été réalisés globalement, puis par paires avec une correction de type Bonferroni, selon le besoin (Poinsot 2004).

Le temps moyen de germination (TMG) est également une variable couramment retrouvée pour différencier des lots de semences sur leur vitesse de germination, notamment lorsque les taux de germination finaux convergent. Cependant, (1) cette variable peut être très différente d'une répétition à l'autre pour les lots aux faibles taux de germination et (2) dans un contexte renouvellement de collections, son importance est moindre. Suivant les cas, sa comparaison sera donc faite avec beaucoup de précautions. Pour comparer les temps moyens de germination entre eux des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été effectués, puis si besoin des tests par paires de Wilcoxon-Mann-Whitney avec une correction de type Bonferroni (Poinsot 2004).



Sondes étalonnées pour le contrôle thermique spatial et temporel des bancs
Banc n°2

a

b

Température relevée par les sondes n°1 et n°2 des bancs de germination (°C)

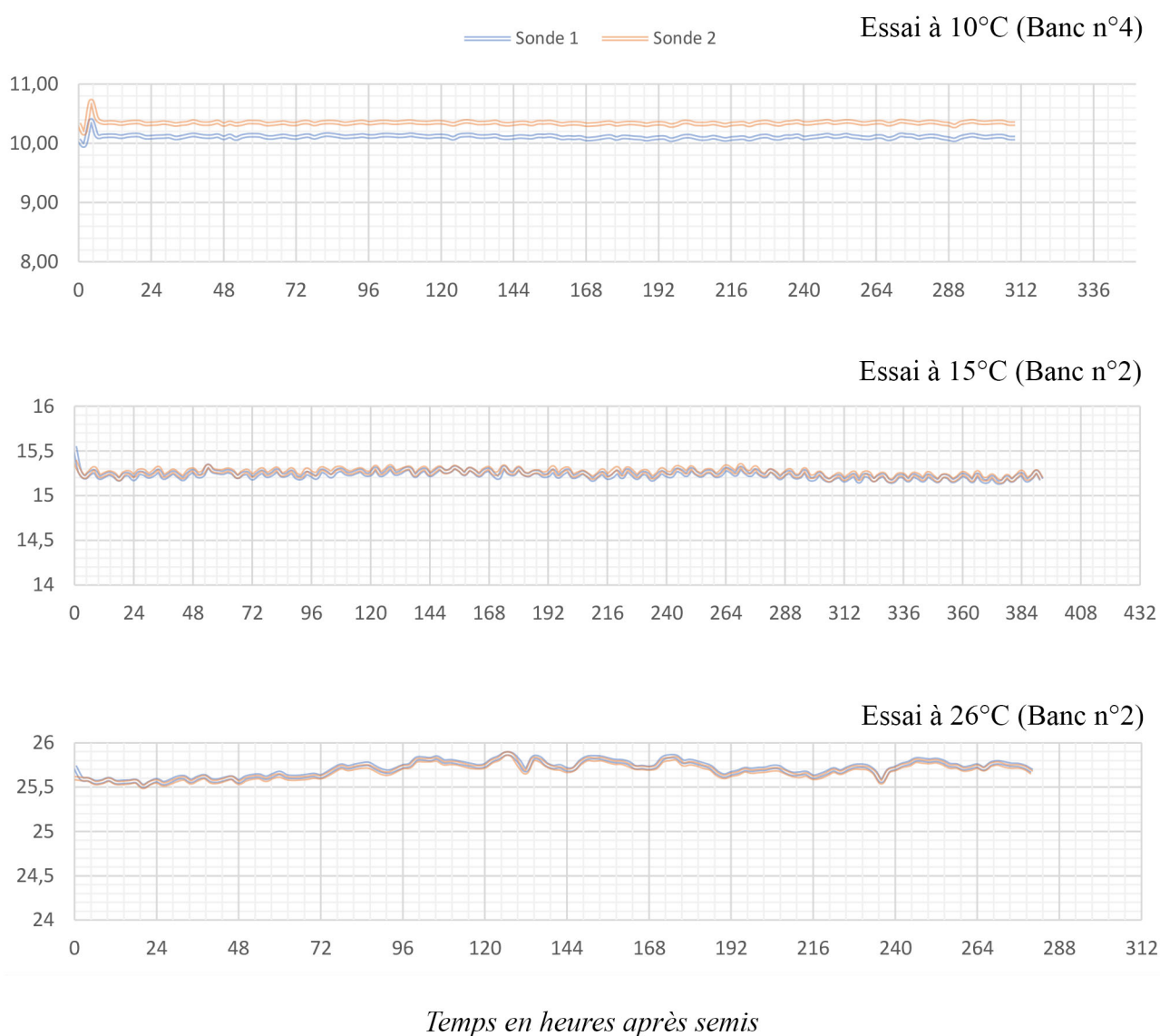


Figure 9 : Contrôles et suivis des températures des bancs de germination n°2 et n°4 de la SNES
Présentation des courbes à 10, 15 et 26°C

Enfin, pour comparer les courbes de germination cumulées, des tests du log-rank sont réalisés. Ces tests non paramétriques, sont principalement retrouvés en médecine pour comparer des courbes de survies. Ils sont toutefois adaptés aux données de germination (Alberti, Timsit & Chevret 2005; McNair *et al.* 2012). Brièvement, le test du log-rank s'apparente à un test du X^2 , sont comparées les germinations observées des germinations attendues sous l'hypothèse d'une égalité entre les courbes comparées (Alberti *et al.* 2005). Le test du log-rank perd toutefois rapidement en puissance lorsque les courbes comparées se croisent ou que les temps d'expériences diffèrent trop (Alberti *et al.* 2005). Compte tenu des contre-indications et de mon expérience, ces tests seront uniquement utilisés pour la comparaison des répétitions entre elles.

Pour chaque test statistique réalisé, un seuil arbitraire pour la p-value (P dans le rapport) de 0,05 est fixé. Chaque conclusion statistique dans le rapport est donc faite avec un risque de 5%.

IV. Résultats de germination en fonction de la température

IV.1 – Des conditions thermiques spatiales et temporelles homogènes pour étudier la germination.

La température est un des facteurs principaux étudiés. Pour un même essai, son homogénéité spatiale (au sein du banc) et temporelle (du début à la fin de l'essai) est donc primordiale. Au cours de ce stage, l'homogénéité thermique spatiale et temporelle des bancs a été contrôlée à 10, 15 et 26°C à l'aide de sondes étalons (figure 9). De ces contrôles, il ressort que la température réelle au sein d'un banc peut varier dans le temps et l'espace jusqu'à 0,3°C. En outre, pour chaque essai, les sondes des bancs indiquent que la température paramétrée est fiable et stable dans le temps à $\pm 0,4^\circ\text{C}$ (b). La différence de température entre chaque essai est donc au minimum de 4,2°C (5-0,8). La variabilité thermique au sein d'un banc est donc, dans le pire des cas, **14 fois plus faible** que la variabilité de température entre les essais (4,2/0,3).

Nous considérons donc que la température au sein des bancs est homogène et conforme à la consigne paramétrée.

IV.2 – Les données lecteur, reproductibles et fiables.

Avant de comparer la germination des lots à l'aide des données lecteur et/ou prolongées, il est nécessaire de vérifier que la méthode d'acquisition visuelle est fiable, d'autant plus que ces

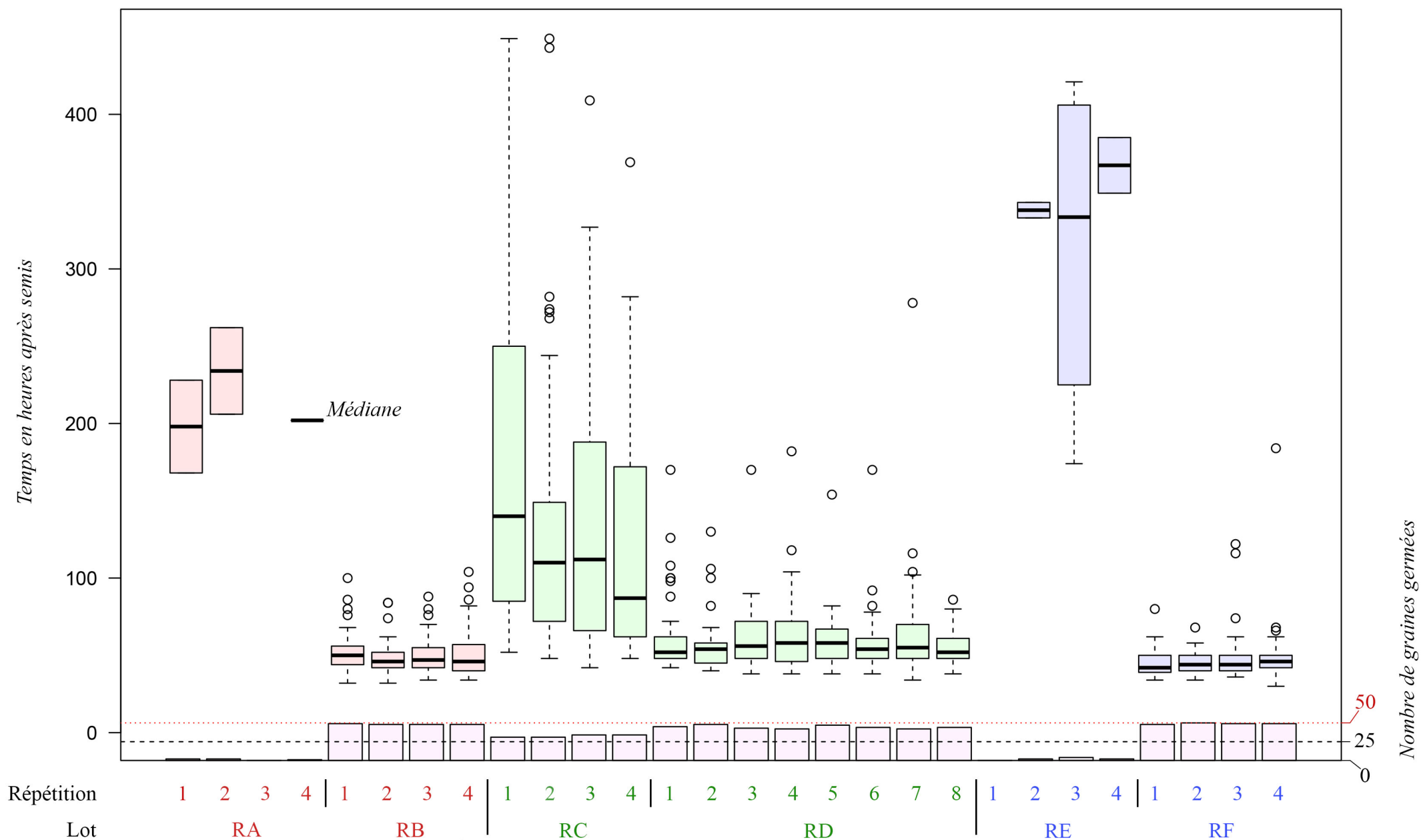


Figure 10 : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 26°C

Boîtes à moustaches réalisées sous R à partir des données prolongées

données sont utilisées par la suite pour caractériser la précision de la méthode automatique. Sont alors comparées les données obtenues visuellement par 2 opérateurs différents, comptant chacun 2 fois la même série, soit un total de 4 comptages. Le comptage est réalisé sur les 400 semences du lot récent R2 semées à 26°C, le lot « contrôle » (8 répétitions). Les tests statistiques montrent que, ni le taux de germination, ni le temps de germination moyen, ni même la globalité des courbes de germination ne varient significativement (toutes les $P > 0,58$). La méthode d'acquisition des données « lecteur », ciblant une radicule de 2mm, semble donc très fiable et reproductible pour cette espèce y compris sur des images.

IV.3 – Des répétitions homogènes à 26°C.

Il convient également de vérifier la répétabilité des résultats entre les répétitions d'un même lot pour un même essai (Sileshi 2012). Le détail des résultats est proposé pour le semis réalisé à 26°C. La figure 10 présente sous forme de boîtes à moustache, la distribution dans le temps des évènements de germination pour cet essai, par répétition. Sous ces boîtes, des histogrammes représentent le nombre de semences germées par répétition de 50 après prolongation des essais. La comparaison des histogrammes montre que le nombre de semences germées entre les répétitions d'un même lot est semblable. Statistiquement il n'existe pas de différence significative entre les taux de germination des différentes répétitions, pour les lots de ray-grass anglais semés à 26°C (toutes les $P > 0,2$).

Graphiquement, les boîtes à moustaches des différentes répétitions des lots récents RB, RD et RF sont relativement semblables. La variabilité est beaucoup plus importante pour les lots anciens des populations R1 et R3. Cette variabilité est la conséquence d'un très faible nombre de semences germées pour ces lots. Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre les temps moyens de germination des répétitions, pour les lots de ray-grass anglais semés à 26°C ($P > 0,1$).

Enfin, afin de confirmer les observations graphiques et les tests statistiques réalisés sur les deux variables précédentes, des tests du log-rank sont réalisés pour comparer les courbes de germination des répétitions entre elles. Là non plus, il ne semble pas exister de différence significative entre les courbes de germination des différentes répétitions pour les lots de ray-grass anglais semés à 26°C ($P > 0,05$).

IV.4 – Des conditions d’essai homogènes pour des essais répétables.

Les mêmes comparaisons graphiques et statistiques sont réalisées pour les répétitions des essais à 10, 15 et 21°C (annexes 1 à 3).

Pour l’essai à 10°C, deux P sont légèrement inférieures au seuil de 0,05. Il s’agit (1) de celle issue du test comparant les temps de germination moyens entre les répétitions du lot RB ($P_a \approx 0,038$) et (2) de celle du test log-rank comparant les répétitions du lot RF ($P_b \approx 0,017$). Pour les deux lots, une semence germe très tardivement. Après élimination de ces deux semences dans la base de données, ($P_a \approx 0,056$) mais P_b reste inférieure à 0,05. Toutefois, compte tenu du fort pouvoir discriminant du test log-rank et des résultats non significatifs des autres tests réalisés pour ce lot, on peut raisonnablement considérer que les répétitions à 10°C sont homogènes.

Pour l’essai à 15°C, seul le test log-rank du lot RC indique une différence significative entre répétitions ($P \approx 0,045$). Cette différence est causée par le taux de germination légèrement plus faible observé de la répétition 4 du lot. Compte tenu du fort pouvoir discriminant du test du log-rank et des autres tests réalisés, on peut là encore raisonnablement considérer que les répétitions à 15°C sont homogènes.

Les répétitions des lots de ray-grass anglais à 21°C sont homogènes. Il n’existe en effet, pour tous les tests effectués, pas de P inférieure à 0,05. Il est toutefois important de remarquer que, comme à 26°C, il n’est pas vraiment pertinent d’analyser/comparer finement les temps de germinations moyens pour les lots où peu de semences germent (lots RA et RE).

En résumé, les taux de germination et les temps moyens de germinations des différentes répétitions sont homogènes pour les 6 lots et pour l’ensemble des essais réalisés sur le ray-grass anglais. En outre, l’homogénéité des 8 répétitions du lot RD, semées sous chaque caméra des bancs n°1 et n°2 à 26°C, renforce la décision précédente : pour un même essai, la variabilité de température intra et/ou inter banc est acceptable.

IV.5 – Comparaison des courbes de germination cumulées des 3 populations ray-grass anglais par lot et selon la température.

Compte tenu des conclusions précédentes, les courbes de germination cumulées issues des données prolongées sont présentées et analysées par populations, en fonction de l’âge du lot et de la température de l’essai (figure 11). Pour chaque graphe on retrouve en abscisses le temps de suivi

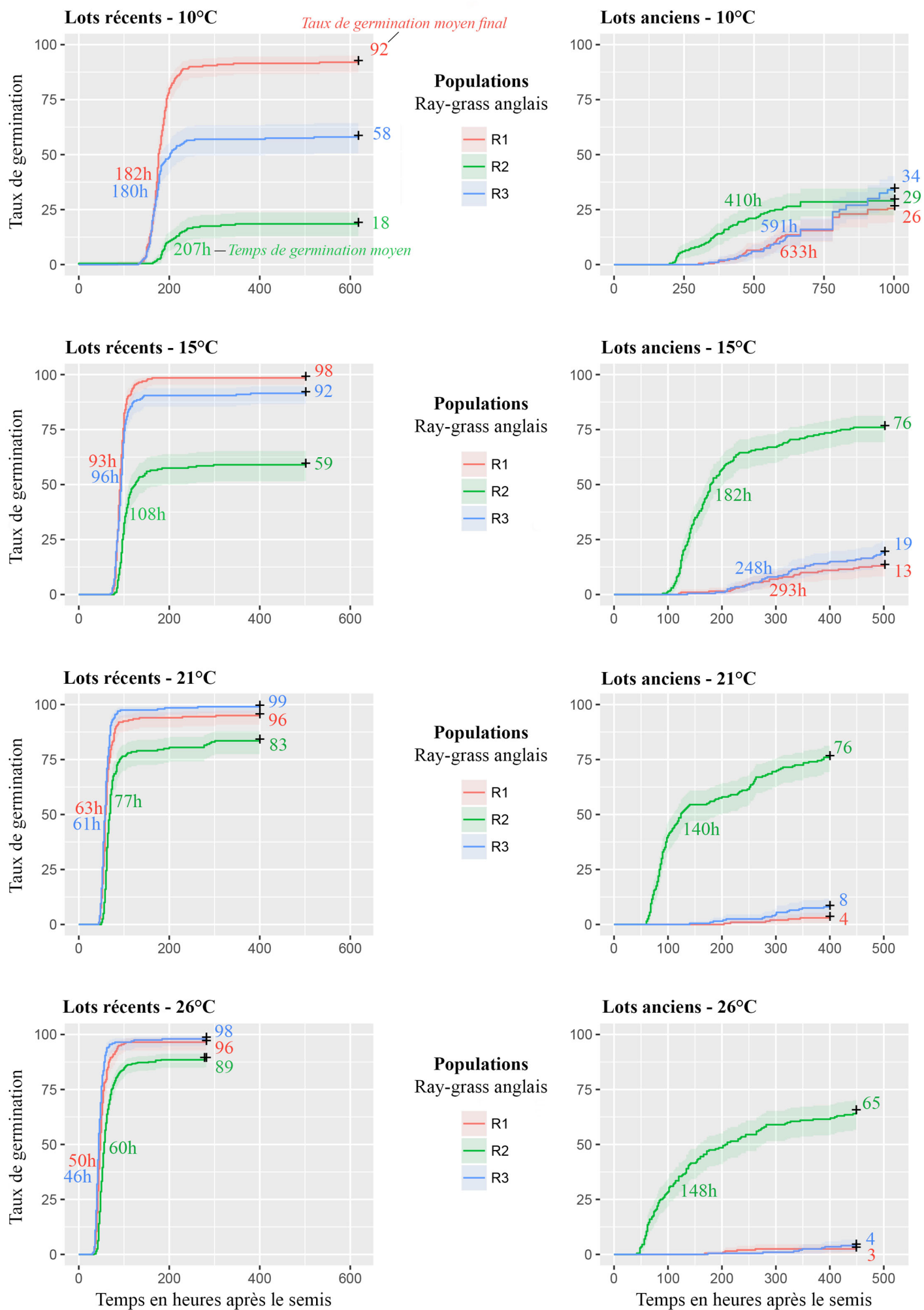


Figure 11 : Courbes de germination cumulées des trois populations de ray-grass anglais
Graphiques réalisés sous R à partir des données prolongées

en heures après le semis et en ordonnées le taux de germination. Les 4 graphes de gauche correspondent aux lots récents, les 4 graphes de droite aux lots anciens des mêmes populations. Les graphes sont organisés de haut en bas par température d'expérience croissante. On retrouve en outre pour chaque courbe les valeurs moyennes des taux de germination et des temps moyens de germination.

La variabilité génétique de la germination mise en évidence aux basses températures pour les lots récents.

Globalement, pour les trois lots récents, plus la température est élevée, plus le pourcentage de semences germées est important et plus les différences entre génotypes diminuent.

Le lot récent R1 (courbe rouge) présente la germination la moins affectée par la température, la variation valant au maximum 6%. Le taux minimal est en effet observé à 10°C (92%) et les taux maximums, relativement équivalents, sont observés à 15, 21 et 26°C (98, 96 et 96%).

Le lot récent R3 (courbe bleue) présente une variabilité plus importante à la température, valant au maximum 41% et concernant principalement les essais à 10 et 15°C. Pour ce lot, le taux de germination moyen minimal est en effet observé à 10°C (58%), bien inférieur à celui observé à 15°C (92%). Le taux augmente par la suite légèrement avec la température et semble se stabiliser dès 21°C (99% à 21°C et 98% à 26°C).

Enfin, le lot récent R2 (courbe verte) est celui dont le taux de germination varie le plus en fonction de la température. La variation maximale observée est en effet de 71% et concerne les deux températures extrêmes. Le taux de germination minimal est ainsi observé à 10°C (18%), il augmente ensuite à 15, 21 et 26°C (59, 83 et 89%). On remarque, là encore, que la variation brutale du taux de germination est observée de 10 à 15°C (le taux de germination triplant). Pour ce lot, le test de viabilité donne un taux de 96%, supérieur donc au taux maximum obtenu sur les bancs (89%). Pourtant à 26°C les semences n'ayant pas germé sur le banc sont clairement mortes (suintements et développement de saprophytes). Les 6% d'écart observés sont liés soit à (1) la variabilité de l'échantillonnage et/ou (2) à la précision des lectures de viabilité après coloration des tissus au chlorure de tétrazolium.

En prenant le lot récent R1 comme référence, le taux de germination du lot récent R3 est **7 fois plus** (41/6) affecté par la température et celui du lot récent l'est R2 **12 fois plus** (71/6). Il semble donc bien exister une variabilité génétique chez ces 3 lots dans la réponse germinative à la température, marquée à 10 et 15°C.

Le temps de germination moyen, la population R2 se démarque par son retard aux basses températures.

Pour les trois lots récents, le temps de germination moyen diminue fortement avec l'augmentation de la température. En effet, toutes populations confondues, la germination à 10°C (190h) prend en moyenne environ 3x plus de temps qu'à 26°C (52h).

Là encore, pour cette variable, la plus forte variation est observée entre les essais à 10 et 15°C. L'augmentation de 5°C entraîne en effet une diminution de moitié des temps moyens de germinations (tous lots confondus, 190h à 10°C et 99h à 15°C). On remarque également que le temps moyen de germination des lots récents R1 et R3 est très semblable pour une même température, la différence maximum étant de 4h à 26°C (46h pour R3 et 50h pour R1) ce qui est vraiment faible, compte tenu du pas de temps d'acquisition des données (2h).

Le temps de germination moyen des semences du lot récent R2 est plus important. Là encore, l'écart entre les trois lots se réduit avec l'augmentation de la température.

En effet, à 10°C, il faut en moyenne 26h de plus pour que les semences du lot récent R2 germent. A 15°C cet écart diminue de moitié et les semences germent avec un « retard » de 13h. Ce retard semble se maintenir à 21 et 26°C.

En prenant comme référence les temps de germination moyens des lots récents R1 et R3, supposés équivalents, le lot récent R2 met donc environ **une journée de plus** pour germer à 10°C et **demie journée de plus** pour les semis réalisés entre 15 et 26°C. Ces résultats renforcent les conclusions précédentes et mettent en valeur la présence d'une variabilité génétique chez ces 3 lots dans la réponse germinative à la température, marquée à 10°C.

IV.6 – Courbes de germination cumulées des lots anciens, l'effet du vieillissement.

La germination des lots anciens R1 et R3, favorisée aux températures basses.

Les taux de germination moyens des lots anciens R1 et R3 sont faibles, relativement équivalents pour un même essai et diminuent avec l'augmentation de la température. Les taux moyens de germination maximums sont en effet observés à 10°C (34% pour R3 et 26% pour R1), chutent rapidement dès 15°C (19% pour R3 et 13% pour R1) et ne représentent plus que quelques semences à 21 et 26°C (8 et 4% respectivement pour R3 et 4 et 3% pour R1). La température optimale de germination de ces lots anciens est donc la plus froide testée. Les essais de viabilités (coloration au chlorure de tétrazolium) renforcent ces observations, le taux de viabilité obtenu pour

le lot ancien R3 est de 33% et celui du lot ancien R1 de 28. La germination des lots anciens R1 et R3 est donc maximale à 10°C.

Une population R2 bien plus tolérante au vieillissement ?

Le lot ancien de la population R2 se comporte différemment des lots anciens R1 et R3. En effet, comme pour les lots récents, son taux de germination moyen minimal est obtenu à 10°C (29%). Les taux maximums eux sont atteints à 15 et 21°C (76%), puis contrairement aux lots récents, à 26°C le taux diminue à nouveau (65%). Il est en outre intéressant de remarquer que les taux de germination obtenus à 10 et 15°C sont plus importants que ceux des lots récents R2 aux mêmes températures. Ces résultats peuvent être expliqués par le vieillissement des semences, favorisant une levée de dormance (Derek Bewley *et al.* 2013).

Pour ce lot, l'essai de viabilité (coloration au chlorure de tétrazolium) indique que 88% des semences sont vivantes. Ce pourcentage est bien supérieur à ceux obtenus pour les lots anciens R3 et R1 (respectivement 33% et 28%). Les semences de la population R2 semblent donc beaucoup moins « sensibles » au vieillissement (environ 10% de pertes) que celles des populations R1 et R3 (environ 70% de pertes).

Pour ces populations l'observation est donc la suivante, plus le taux de viabilité d'un lot est faible, plus la température de germination des semences vivantes est basse.

Le vieillissement et/ou le froid retardent la germination.

La comparaison des temps moyens de germination des lots anciens R1 et R3 ne semble pas pertinente compte tenu du très faible nombre de semences germées et du prolongement réalisé en module climatique à 10°C (fréquence d'acquisition des données \approx 24h).

Comme pour les lots récents, plus la température est élevée plus les semences des lots anciens germent rapidement. Pour le lot ancien R2 on passe ainsi d'un temps moyen de germination de 410 heures à 10°C à un temps moyen de germination de 148h à 26°C.

Le temps de germination moyen des lots anciens reste toutefois, pour une même température, inférieur à celui des lots récents. Pour une même température, les semences de lots anciens R2 germent en effet environ 2 fois plus lentement que celles des lots récents (410h contre 207h à 10°C, 182h contre 108h à 15°C, 140h contre 77h à 21°C et 148h contre 60h à 26°C.).

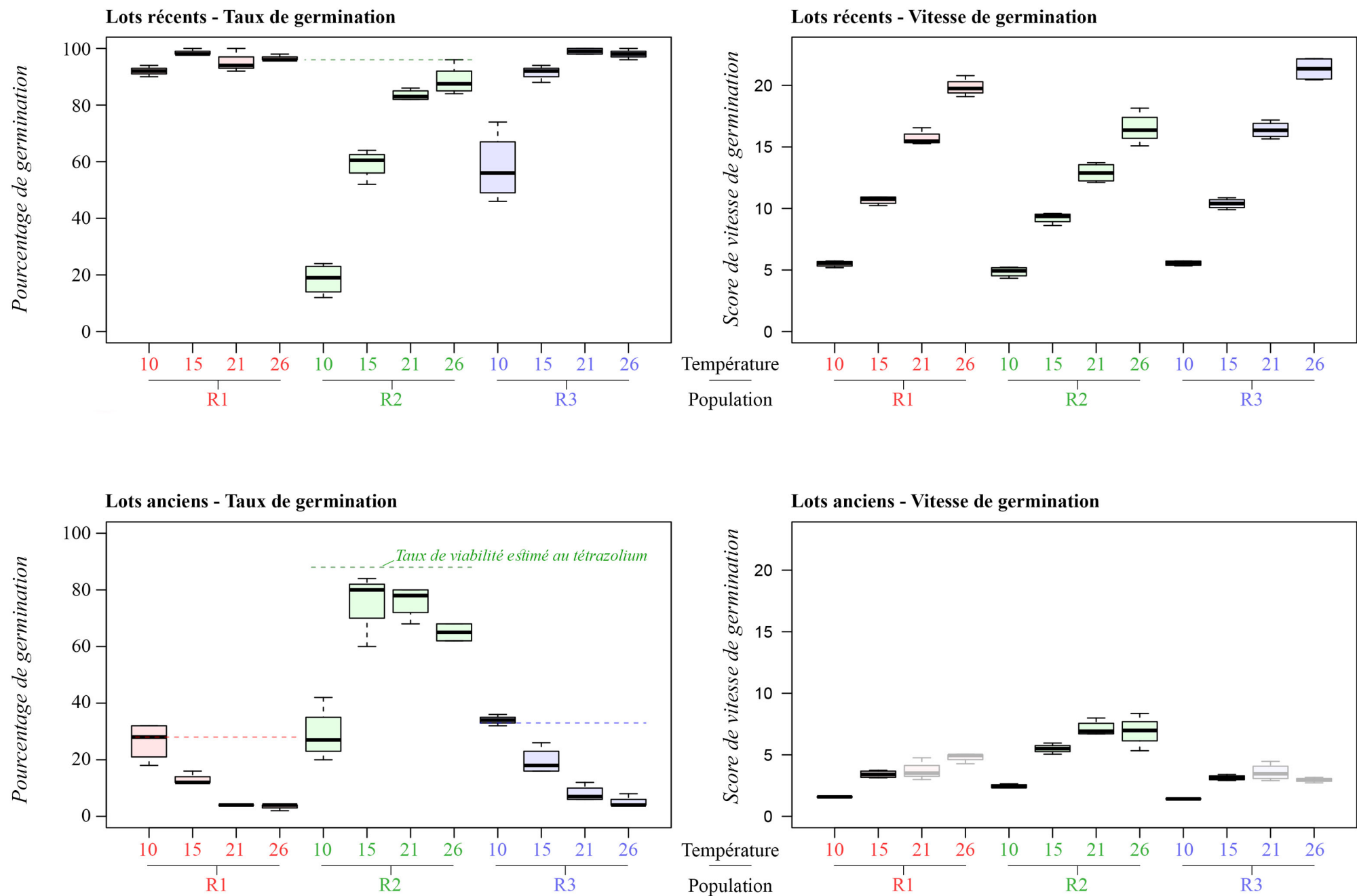


Figure 12 : Vitesses moyennes, taux moyens de germination et taux de viabilité des populations de ray-grass anglais en fonction de la température
Boîtes à moustaches réalisées sous R à partir des données prolongées

IV.7 – Les boîtes à moustaches, comparaison entre répétitions des taux et temps moyens de germination.

Afin de renforcer ces premières observations, les deux variables discutées sont comparées statistiquement et présentées en figure 12 sous forme de boîtes à moustaches (prise en compte des répétitions). Sur la partie gauche de la figure sont représentés les taux de germination moyens, en fonction du lot et de la température. En haut ceux des lots récents, en bas ceux des lots anciens. Suivant le même ordre de disposition, la partie droite de la figure affiche les vitesses moyennes de germination. La vitesse moyenne de germination est une représentation plus intuitive du temps moyen de germination, plus la vitesse est importante, plus les semences germent rapidement. ($Vitesse\ de\ germination = \frac{1}{1000 * Temps\ moyen\ de\ germination}$). Les valeurs de vitesses de germination facilitent la comparaison des lots.

Le taux de germination des lots récents, les maximums R1 et R3 semblables.

Les observations faites sur les taux de germination des lots récents sont confirmées statistiquement. Le taux de germination des populations R1 et R3 n'est pas significativement différent de 10 à 26°C, ($P > 0,05$). La germination de la population R2 affectée par la température : à 10, 15 et 21°C les taux atteints sont en effet significativement différents les uns des autres ($P < 3,2 \times 10^{-5}$). Toutes répétitions confondues, les taux de germination du lot récent R2 sont équivalents à 21 et 26° ($P \approx 0,12$). Enfin, pour le lot récent R3 seule une température (10°C) entraîne la diminution significative du nombre de semences germées ($P < 8,5 \times 10^{-12}$). Pour le lot récent R1, le taux de germination maximum est donc atteint dès 10°C. Le taux de germination maximum du lot récent R3 est quant à lui atteint dès 15°C. Dès 15°C les taux de germination maximums des lots récents R1 et R3 ne sont pas significativement différents ($P > 0,1$). Le taux de germination maximum des lots récents R2 quant à lui est atteint à partir de 21°C mais reste légèrement inférieur aux maximums des lots récents R1 et R3 ($P < 0,006$).

La germination des lots anciens, favorisée à 10 et 15°C.

Pour une même température, les taux de germination lots anciens R1 et R3 ne sont pas significativement différents ($P \approx 1$). Pour ces deux populations, le taux maximum est atteint à 10°C. Pour les populations R1 et R3, toutes températures confondues, les taux de germination des lots récents sont bien significativement supérieurs aux taux de germination des lots anciens ($P < 2 \times 10^{-16}$). Les taux de germination des lots anciens R2 ont un profil nettement différent. Le plus faible taux de germination est bien observé à 10°C, celui-ci n'étant pas significativement différent des

taux maximums observés pour les lots anciens R1 et R3 ($P > 0,7$). Pour cette population, le taux maximum semble être atteint dès 15°C et n'est pas significativement différent des taux à 21°C et 26°C. En outre, toujours pour la population R2, le taux de germination maximum des lots anciens n'est pas significativement différent, de celui des lots récents à 21°C ($P \approx 1$).

La vitesse moyenne de germination des lots récents, R2 à la traine.

Concernant la vitesse moyenne de germination, les observations précédentes sont confirmées statistiquement. Pour chaque lot, la vitesse de germination augmente de manière significative avec la température. Les vitesses de germination des lots récents des populations R1 et R3, pour une même température, ne sont pas significativement différentes ($P > 0,08$). Enfin pour une température donnée, la vitesse de germination des lots récents R1 et/ou R3 est toujours significativement supérieure à celle du lot récent R2 ($P < 0,00012$).

IV.8 – L'acquisition automatique des données de germination.

Qu'en est-il des données acquises de manière automatique à l'aide des macros de segmentation développées pendant le stage ? Dans les parties suivantes seront comparées les données acquises automatiques aux données lecteur, les temps d'observations sont donc plus courts que ceux de la partie précédente (*données prolongées*).

Une méthode fonctionnant pour 91% des semences suivies.

Tous essais confondus, 5000 semences de ray-grass anglais ont été semées sur les bancs. Pour une semence, au terme de l'essai, deux états sont possibles (semence germée ou semence non germée). Lorsque l'état final est le même pour un comptage lecteur et automatique, on parle de bon résultat. Lorsque qu'une semence est comptée germée par le lecteur et non germée par l'ordinateur, on parle de faux négatif. Lorsque qu'une semence est comptée non germée par le lecteur et germée par l'ordinateur, on parle de faux positif.

Tous essais confondus, les bons résultats représentent 91,44% des semences. Les faux positifs représentent 4,18% des semences et les faux négatifs 4,38%. Les faux positifs et négatifs sont principalement causés par le même phénomène biologique : l'hétérogénéité dans la vitesse de développement des lots. En effet, (1) le développement des racines peut entraîner le déplacement de semences voisines (faux positifs) et (2) le déplacement des semences germées peut entraîner le

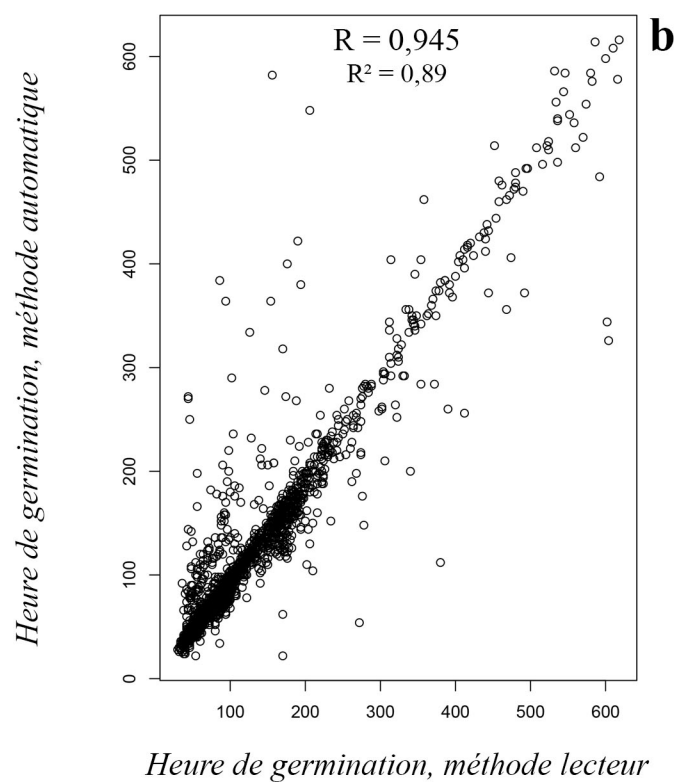
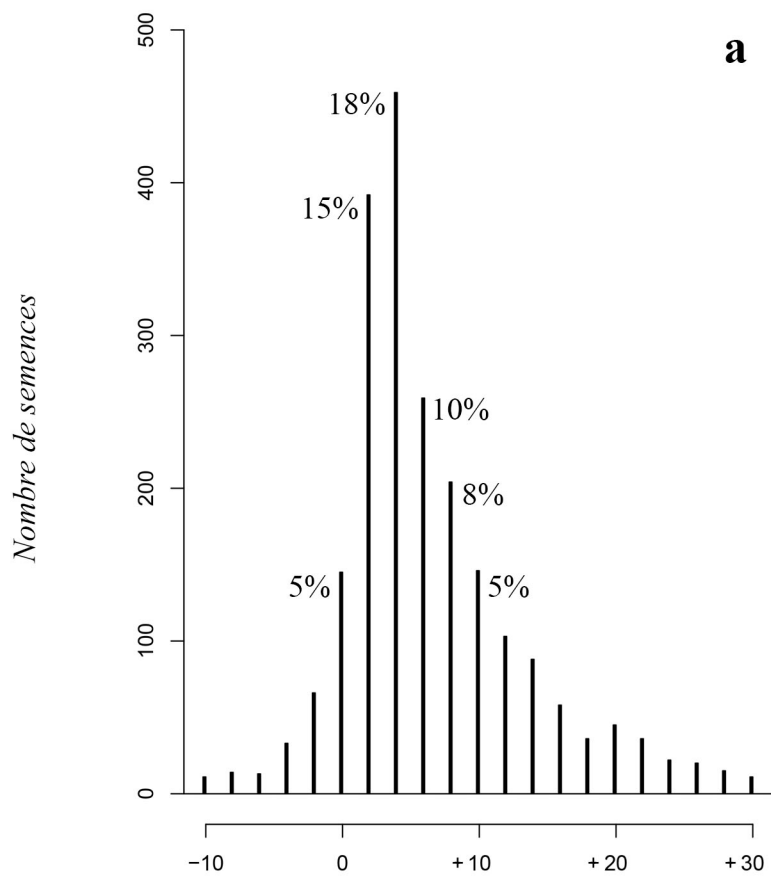


Figure 13 : Comparaisons temporelles de la méthode automatique par rapport à la méthode visuelle
 (a) Histogramme du décalage horaire de la méthode automatique, par rapport à la méthode lecteur, sur la totalité des semences,
 (b) corrélation des temps de germination auto/lecteur

Graphiques réalisés sous R à l'aide des données automatiques et lecteur

débordement sur les cases voisines de semences n'ayant pas encore germé (faux négatif, voir *partie III*).

Toutes répétitions confondues, il n'existe pas de différence significative dans le fonctionnement des macros en fonction (1) de la température (87,75% de bons résultats à 10°C ; 90,08% à 15°C ; 95,91% à 21°C et 91,92% à 26°C : ($P \approx 0,94$), (2) de l'âge (91,75% pour les lots anciens et 91,15% pour les récents : ($P \approx 0,97$)), ou encore (3) de la population (90,06% pour R1 ; 91,11% pour R2 et 93,18% pour R3 : ($P \approx 0,97$)).

Données lecteur et automatiques, un décalage moyen de 4h synchronisé à 94%.

La méthode automatique détermine donc correctement l'état final de 9 semences sur 10 semées, mais le fait-elle au bon moment ? La figure 13 (a) présente sous forme d'histogramme, le décalage positif dans le temps de germination des semences analysées automatiquement par rapport aux semences analysées manuellement. Par exemple, si pour une semence le décalage perçu est de 2h, cela signifie que l'ordinateur détermine la germination de la semence 2h en avance (soit une image) par rapport au lecteur. En moyenne, pour les 91,44% de bons résultats, cette avance est de 4h. Ce faible décalage ne pénalise pas la comparaison des lots car les heures de germination déterminées automatiquement sont corrélées à 94,52% (et $R^2 = 0,89$) avec celles déterminées par le lecteur (Figure 13 b).

La méthode développée utilise le déplacement du centre d'inertie de la semence comme proxy de sa germination. Dans le cadre du programme RéGàTe et donc des comptages visuels, la semence est comptée germée à partir d'une certaine taille de radicule (2mm), bien souvent après ses premiers « mouvements ». Il est donc logique que la méthode automatique « anticipe » la germination, vis à vis des critères du programme RéGàTe.

Les courbes de germination cumulées automatiques des lots récents.

Sur la figure 14, au verso, sont comparées les courbes de germination des lots récents obtenues par les deux méthodes. Sur la partie gauche, les courbes de germination « lecteur » et sur la partie droite les courbes « automatiques ». La tendance générale des courbes est bien conservée d'une méthode à l'autre. D'une méthode à l'autre, le taux de germination augmente et le temps moyen de germination diminue avec l'augmentation de la température. Les différences entre les trois lots sont également maximales à 10°C et minimales à 26°C. En outre, le lot récent R2 se démarque nettement des deux lots R1 et R3.

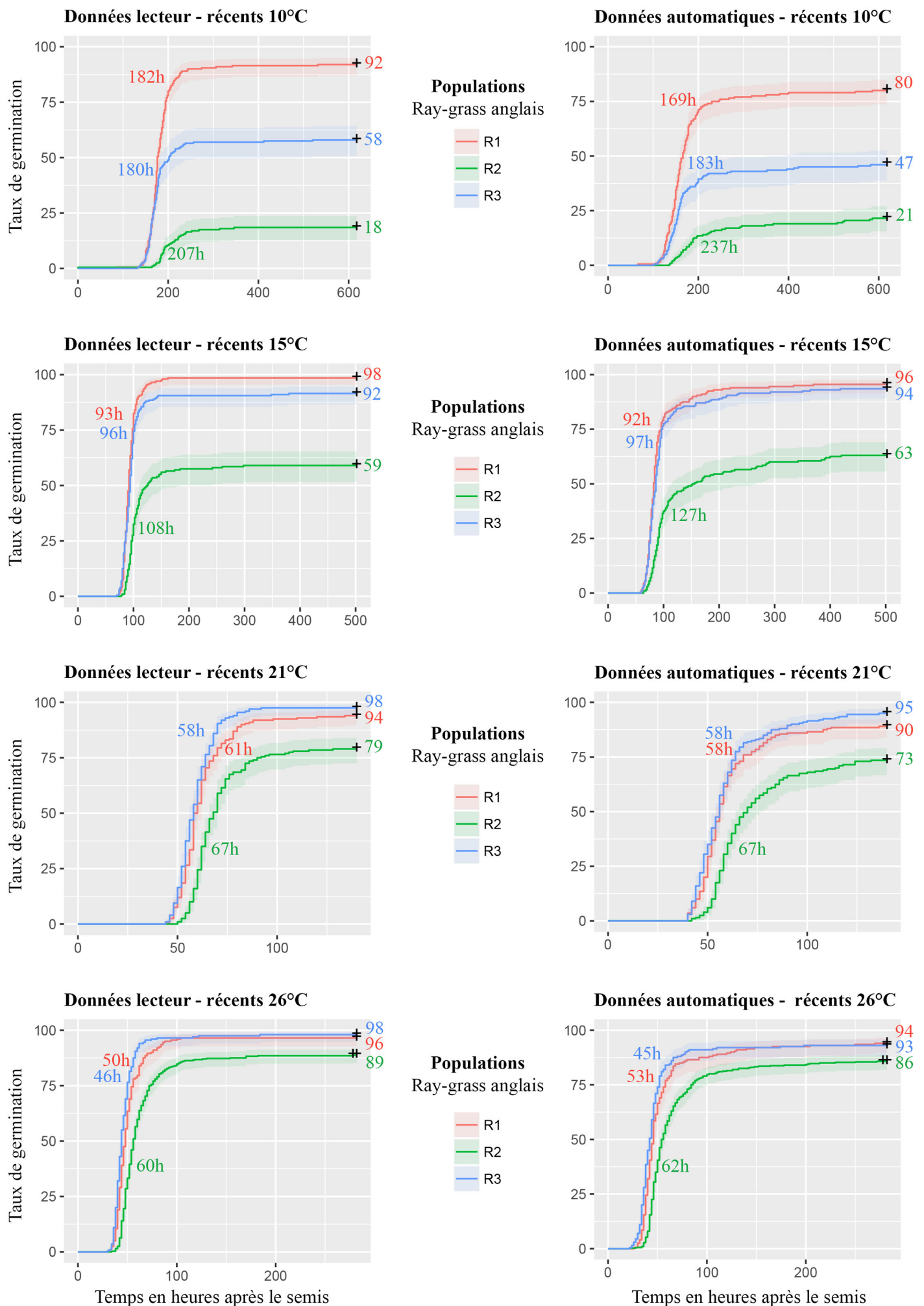


Figure 14 : Courbes de germination cumulées lecteur et automatiques des lots récents de ray-grass anglais
Graphiques réalisés sous R à partir des données lecteur et automatiques

Pour 15°C, 21°C et 26°C, les taux de germination en fin d'essais sont semblables et varient en moyenne de 3% d'une méthode à l'autre (Le maximum étant de 6% pour le lot récent R2 à 21°C). Pour ces 3 températures, les temps de germination moyens obtenus sont également semblables d'une méthode à l'autre. Là encore, on remarque que les plus grands écarts concernent le lot récent R2 à 15°C (+19h).

Seul le taux de germination moyen à 10°C est sous-évalué par la méthode automatique (92% contre 80% pour R1 et 58% contre 47% pour R3). Le nombre de faux négatifs semble donc augmenter avec le froid et/ou la durée de suivi.

Les courbes de germination cumulées automatiques des lots anciens.

De la même façon, sur la figure 15, au verso, sont représentées les courbes de germination des lots anciens. Pour ces lots, la tendance générale des courbes est également conservée d'une méthode à l'autre. Le taux de germination des lots anciens est en effet favorisé à 15°C et le temps moyen de germination des trois lots diminue avec l'augmentation de la température. Là encore, d'une méthode à l'autre, le taux de germination du lot ancien R2 à 15°C est supérieur à celui du lot récent R2 à 15°C.

Les résultats de la partie précédente montraient que la germination des lots anciens était maximale à 10°C. Le résultat est ici différent car nous ne disposons pas de données prolongées pour la méthode automatique.

On remarque toutefois que le taux de germination moyen du lot ancien R1 à 10°C, 15°C et 26°C est surestimé par la méthode automatique (+7% à 10°C, +15% à 15°C et +14% à 26°C).

Le gain de temps et de précision offert par la méthode automatique.

Les quelques erreurs effectuées par la méthode automatique sont largement compensées par le gain de temps et de précision acquis. Le comptage « lecteur » représente en effet environ 4 heures de travail continues et fastidieuses pour la vue, par banc de germination. Pour une même série, le comptage automatique nécessite **14x moins de temps** de travail (environ 15 minutes par banc).

Les données sont en outre acquises toutes les 2 heures et permettent, comme précisé en introduction, de suivre bien plus finement et de manière homogène la germination des lots, comparativement aux expériences réalisées en boîtes.

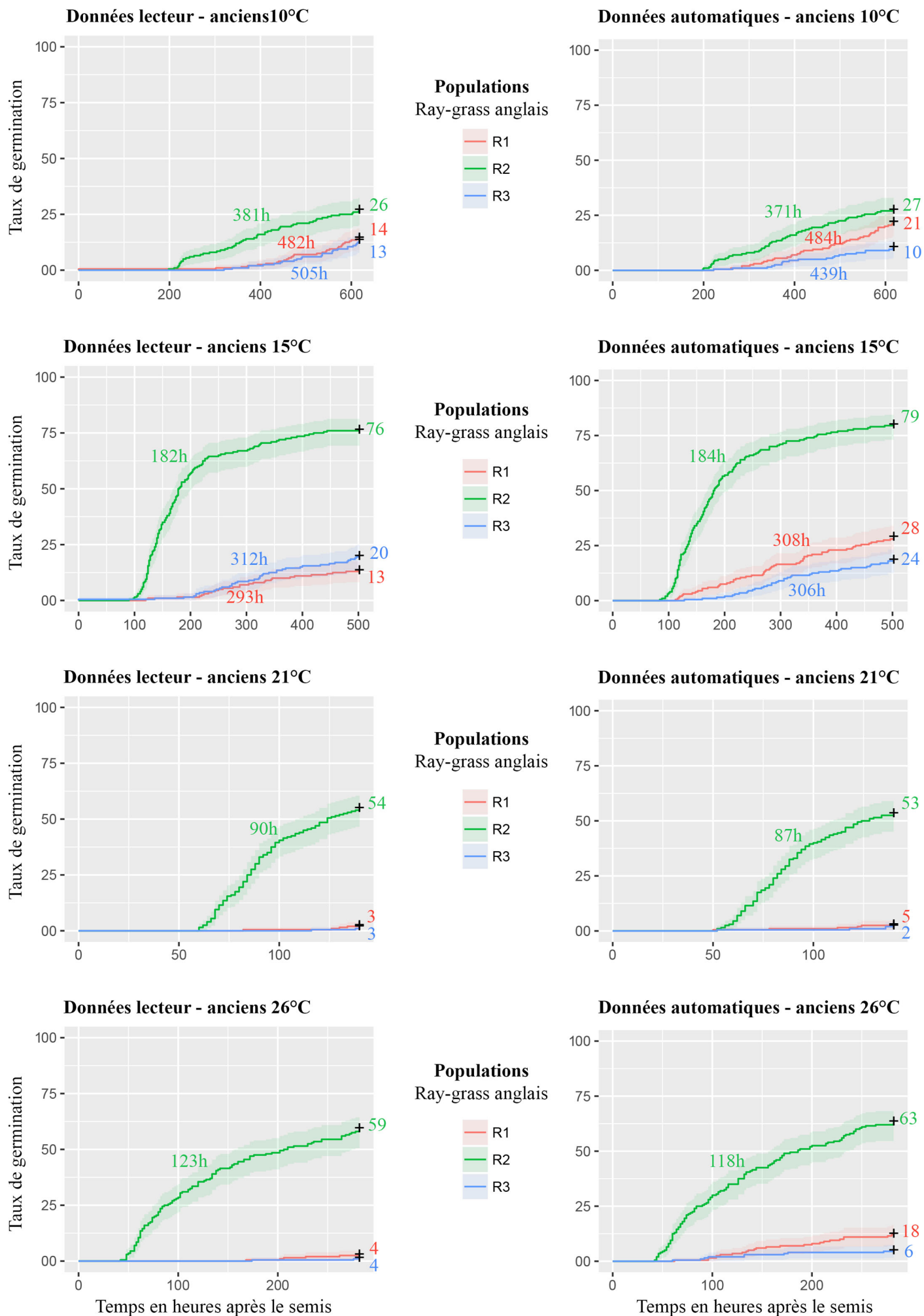


Figure 15 : Courbes de germination cumulées lecteur et automatiques des lots anciens de ray-grass anglais
Graphiques réalisés sous R à partir des données lecteur et automatiques

V. Conclusions et discussions

V.1 – Bilan de la méthode automatique développée.

La méthode automatique mise au point au cours de ce stage fonctionne pour 91% des semences et détermine l'heure de germination d'une semence avec une avance moyenne de 4h ; elle est corrélée à 94% par rapport à un critère de germination correspondant à une radicule de 2mm.

Les courbes de germination lecteur et automatiques sont très semblables et les mêmes conclusions biologiques sont déduites quelle que soit la méthode. Pour les différents lots, les taux de germination sont en outre corrélés à 96% entre les deux méthodes, pour une même température.

La méthode automatique développée semble donc suffisamment précise pour la comparaison des lots étudiés et pour les objectifs du projet RéGàTe. Abraham E.G., chef du projet RéGàTe, est à ce titre satisfait du résultat et valide le fonctionnement actuel de la méthode pour le ray-grass anglais à 10, 15, 21 et 26°C.

Le plus grand nombre d'erreurs concerne l'essai le plus long, celui à 10°C (87,75% de bons résultats). Ce résultat s'explique par (1) l'hétérogénéité des lots marquée aux températures froides, (2) le fait que l'essai à 10°C soit le plus long et (3) les plans de semis actuels accolant lots anciens et récents. Ainsi, pour l'essai à 10°C, le risque que des radicules viennent déplacer des semences voisines non germées est le plus important et explique les faux positifs et faux négatifs rencontrés.

Une méthode fonctionnant aussi pour la fétuque élevée.

Dans le cadre du projet RéGàTe, les mêmes essais ont été réalisés pour 4 populations de fétuque élevée. Les résultats déjà disponibles montrent que la méthode automatique fonctionne également sur cette seconde espèce qui présente des semences proches de celles du ray-grass anglais avec toutefois une vitesse de germination plus lente qui fait que des essais sont encore en cours à la fin de mon stage.

La qualité d'acquisition automatique des données de germination pourrait être améliorée et le pourcentage d'erreurs diminué en travaillant principalement sur (1) le plan de semis et (2) sur les caractéristiques physiques du papier/buvard de germination utilisé telles que la couleur ou le grain.

Améliorer l'acquisition automatique : grouper les lots par vitesses de développement.

Nous avons vu, pour l'ensemble des résultats, que les conditions des bancs sont suffisamment homogènes pour nos objectifs. Nous avons également vu que les principales erreurs faites par les macros de segmentation développées concernent la proximité de lots ayant des vitesses de développement hétérogènes. Pour la suite des essais réalisés sur les graminées, je recommande de grouper les lots ayant une vitesse de développement semblable sous une même caméra, l'idéal étant de grouper sous une même caméra les semences issues d'un même lot.

Compte tenu des résultats obtenus, un rapide test de germination sur une cinquantaine de semences, par lot, pendant 4 à 5 jours à 26°C permettrait de trier grossièrement les lots en fonction de leurs vitesses de développement. De ce premier test découlerait ainsi une adéquation du plan de semis.

Le groupement des lots par caméras permettra en outre de ne plus avoir à prolonger les essais après que les semences germées aient été retirées et donc d'obtenir des données « automatiques » sur la totalité d'un essai.

Améliorer l'acquisition automatique : un papier sur mesure.

Le papier bleu marine utilisé représente le meilleur compromis actuel (coût, segmentation et disponibilité). Celui-ci présente toutefois certaines caractéristiques pénalisant l'acquisition automatique des données. Nous retenons deux défauts principaux, (1) le grain du papier un peu trop grossier et hétérogène, limitant la segmentation des racines et induisant l'apparition d'un bruit de fond sur certaines images et (2) un diamètre de « maille/fibres » trop important, favorisant la pénétration des racines dans le papier.

Le papier de germination impactant directement la qualité de l'analyse d'images, j'ai entretenu au cours du stage des échanges avec représentant commercial de la société Ahlstrom pour la branche de l'entreprise dédiée aux papiers à usages scientifiques. J'ai ainsi pu tester plusieurs échantillons de papiers de germination (principalement de couleurs foncées/sombres). Une rencontre en fin du mois de Juillet a permis (1) de préciser nos attentes et les caractéristiques idéales recherchées pour le papier ainsi que (2) les compétences techniques de fabrication d'Ahlstrom.

Compte tenu de l'ensemble des essais, nos attentes sont (1) un papier au grain fin et homogène, permettant de réduire le bruit de fond, (2) un maillage plus petit que le diamètre moyen des racines ($<0,5\text{mm}$), (3) une teinte bleue foncée semblant être adéquate à la segmentation de cette espèce et enfin (4) des papiers déjà dimensionnés à la surface nécessaire pour 400 semences par caméras ($34 \times 22\text{cm}$).

Notons également que, même si la couleur bleu marine semble être convenable, il pourrait être intéressant d'essayer d'autres couleurs non disponibles au GEVES, le vert ou le rouge par exemple.

Nous avons bon espoir de penser que les nouveaux papiers permettront d'améliorer nettement la segmentation des semences et de leurs racines, pour le ray-grass anglais mais aussi pour l'ensemble des espèces phénotypées par la SNES sur les bancs de germination.

V.2 – Existe-t-il une variabilité intra-spécifique dans la réponse germinative à la température chez les populations sauvages de ray-grass anglais ?

Les lots récents comparés ont été produits et conservés dans les mêmes conditions. Compte tenu de l'homogénéité des répétitions et des conditions d'essais, les différences observées sont donc supposées être uniquement liées aux différences génétiques entre les trois populations.

La vitesse de germination et le taux de germination augmentent significativement, avec l'augmentation de la température. A l'échelle de l'espèce, les lots récents semblent donc suivre globalement la même tendance.

Par contre, les différences observées entre les lots récents diminuent significativement avec l'augmentation de la température. Ainsi, pour les deux variables taux et vitesse de germination, les différences entre les trois populations sont statistiquement maximales à 10°C et minimales à 26°C .

On remarquera néanmoins que, pour une température donnée, la vitesse de germination des populations R1 et R2 n'est jamais significativement statistiquement différente. Seuls les taux de germination de ces deux populations se différencient, à 10 et 15°C . Un classement de ces lots, suivant les deux variables comparées, placerait la population R1 en tête car capable de germer dans une large gamme thermique. En effet pour cette population, le taux de germination élevé ne semble pas être affecté par les températures testées. Viendrait ensuite la population R3, dont le taux de germination rejoint rapidement celui de la population R1, dès $15/21^{\circ}\text{C}$. Et enfin en troisième, la population R2 fortement pénalisée pour germer à 10°C .

Ces essais confirment donc la présence d'une variabilité intra-spécifique génétique dans la réponse germinative à la température chez les populations sauvages de ray-grass anglais, d'avantage marquée aux faibles températures.

V.3 – Le vieillissement d'un lot de semence entraîne-t-il une modification de la réponse germinative à la température ?

Alors que la germination des lots récents est nettement favorisée à 26°C on remarque que celle des lots anciens l'est à 10°C pour les lots R1 et R3 et à 15°C pour le lot R2.

On observe toutefois que le pourcentage de viabilité des lots R2 (88%) est bien supérieur à ceux des lots anciens R1 et R3 (33 et 28%). Il semble donc peu prudent d'utiliser l'âge d'un de semences lot comme seul facteur de comparaison.

En effet, les lots anciens comparés sont certes stockés dans les mêmes conditions, mais leurs années et lieux de collectent diffèrent (R1 et R3 en 1990 et R2 en 1991). Or, on sait que le pourcentage de viabilité d'un lot de semence est modulé par (1) les conditions et de la durée de conservation, (2) le génotype des semences et (3) les méthodes et conditions environnementales lors de leur développement, (Derek Bewley *et al.* 2013). Ainsi, les grandes différences observées entre les taux de germination de ces lots peuvent être expliquées par (1) effectivement une meilleure résistance au vieillissement des semences de la population R2 et/ou (2) des conditions en 1990 pénalisantes pour le développement des semences des lots R1 et R3. Cette hypothèse reste donc à tester sur du matériel ancien plus homogène.

Même si le pourcentage de viabilité d'un lot de semence diminue systématiquement avec sa durée de conservation (Derek Bewley *et al.* 2013), le taux de viabilité des semences semble donc ici être un meilleur facteur pour le choix de température optimale de germination.

Les résultats obtenus pendant ce stage permettent donc de valider et de préciser une partie des résultats obtenus par l'INRA de Lusignan. Chez le ray-grass anglais, plus le taux de viabilité d'un lot de semences est faible, plus la température de germination optimale semble être basse.

V.4 – Suite du programme RéGàTe, le vieillissement contrôlé des lots récents.

La suite du projet RéGàTe implique de vieillir de façon contrôlée les lots récents des trois populations de ray-grass anglais et des quatre de fétuque élevée pour faire la part entre génétique et qualité du lot sur la germination à deux températures. Le phénotypage germinatif de ces nouveaux lots devrait ainsi permettre d'obtenir des lots intermédiaires ayant été produits dans les mêmes conditions et dont le taux de viabilité se situerait entre celui des lots récents et anciens actuels.

La comparaison de la réponse germinative à la température de ces lots permettra donc de renforcer les hypothèses discutées dans ce rapport en disposant de lots artificiellement « anciens » produits dans les mêmes conditions.

On remarque en outre que les plus grandes différences observées concernent les essais à 10 et 15°C. Il pourrait donc être intéressant d'ajouter une nouvelle température d'essai intermédiaire comprise entre 10°C et 15°C.

Il pourrait également être intéressant de réaliser un essai de germination à 30 degrés pour ces trois lots afin notamment de suivre le taux de germination du lot récent R2. Si le taux maximal reste celui observé à 26°C, ce test permettra en outre de préciser l'efficacité de l'essai de viabilité réalisé au chlorure de tétrazolium. De même, un essai de germination à 5 degrés permettrait de voir si le lot récent de la population R1, d'origine montagnarde, est toujours capable de germer à très basse température.

Pour ce qui est d'une application à plus long terme, la population R1 serait une bonne candidate pour la création de variétés de ray-grass anglais, fourragères ou gazonnières semées sous une large gamme de températures. Les résultats indiquent en outre qu'il serait préférable de multiplier les vieux lots de ray-grass anglais du CRG à partir d'un semis à 15°C, offrant un compromis intéressant entre vitesse de germination et taux de germination final.

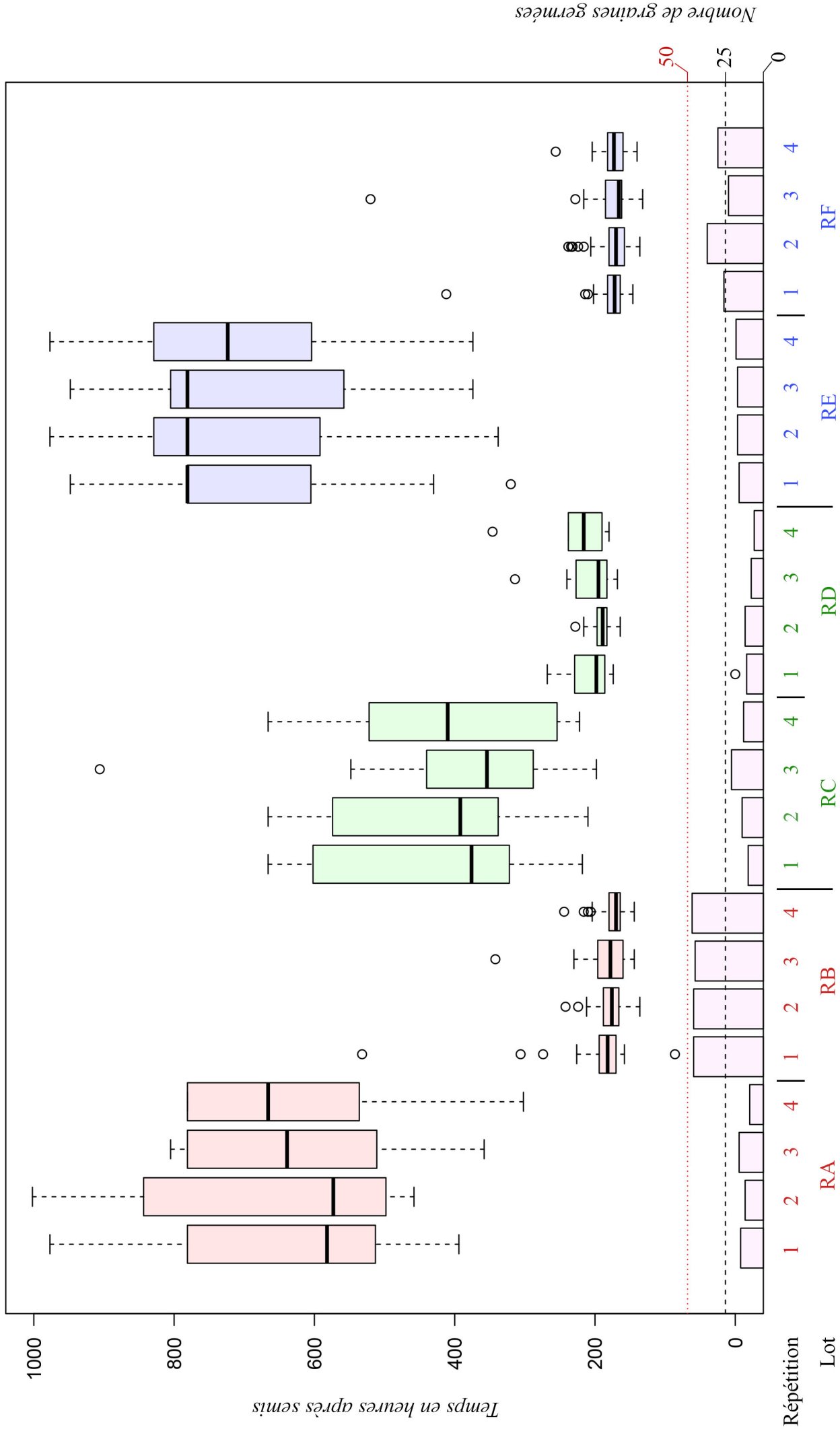
Bibliographie

- Ahmed, L.Q. (2015) Analyse de La Variabilité Inter- et Intra-Spécifique de Cinq Espèces Prariales En Réponse À La Température Pendant La Germination et La Phase Hétérotrophe Initiale. Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Sciences pour l'Environnement Gay Lussac, Biologie de l'environnement, des populations, écologie., Université de Poitiers, Lusignan, p. 256.
- Alberti, C., Timsit, J.-F. & Chevret, S. (2005) [Survival analysis - the log rank test]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, **22**, pp. 829–832.
- Aquila, A.D. (2009) Digital imaging information technology applied to seed germination testing. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **29**, pp. 213–221.
- Belin, É., Rousseau, D., Rojas-Varela, J., Demilly, D., Wagner, M.-H., Cathala, M.-H. & Dürr, C. (2011) Thermography as non invasive functional imaging for monitoring seedling growth. *Computers and Electronics in Agriculture*, **79**, pp. 236–240.
- Côme, D. & Corbineau, F. (2006) Dictionnaire de la biologie des semences et des plantules, p. 226, TEC & DOC. Lavoisier, Paris.
- Demilly, D., Ducournau, S., Wagner, M.-H. & Dürr Carolyne. (2014) Digital imaging of seed germination. *Plant Image Analysis : Fundamentals and Applications*, pp. 147-164. CRC Press, Florida.
- Derek Bewley, J., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. & Nonogaki, H. (2013) *Seeds - Physiology of Development, Germination and Dormancy*, p. 392, 3rd Edition. Springer Science & Business Media, Netherlands.
- Dias, P.M.B., Brunel-Muguet, S., Dürr, C., Huguet, T., Demilly, D., Wagner, M.-H. & Teulat-Merah, B. (2011) QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics*, **122**, 429–444.
- Ducournau, S., Feutry, A., Plainchault, P., Revollon, P., Vigouroux, B. & Wagner, M.H. (2005) Using computer vision to monitor germination time course of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Seed Science and Technology*, **33**, pp. 329–340.
- Gallais, A. (2011) Méthodes de création de variétés en amélioration des plantes, p. 278, 1st ed. Editions QUAE GIE.
- Gaujour, E., Amiaud, B., Mignolet, C. & Plantureux, S. (2012) Factors and processes affecting plant biodiversity in permanent grasslands. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **32**, pp. 133–160.
- Godefroid, S., Vyver, A.V. de & Vanderborght, T. (2010) Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation*, **19**, pp. 1365–1383.
- Gupta, S.D. & Ibaraki, Y. (2014) *Plant Image Analysis : Fundamentals and Applications*, p. 385, CRC Press, Florida.

- Hoyle, G.L., Steadman, K.J., Good, R.B., McIntosh, E.J., Galea, L.M.E. & Nicotra, A.B. (2015) Seed germination strategies: an evolutionary trajectory independent of vegetative functional traits. *Frontiers in Plant Science*, **6**, p. 731.
- IPCC. (2014); Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change Working Group III Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change 2014, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p. 1454.
- ISTA (ed). (2017a) Chapitre 5 : L'essai de germination., pp. 111–166. Association Internationale d'Essais de Semences (ISTA), Bassersdorf, Suisse.
- ISTA (ed). (2017b) Chapitre 6 : Essai biochimique pour la détermination de la viabilité : l'essai topographique au tétrazolium., pp. 167–192. Association Internationale d'Essais de Semences (ISTA), Bassersdorf, Suisse.
- Lemaire, G., Wilkins, R. & Hodgson, J. (2005) Challenges for grassland science: managing research priorities. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **108**, pp. 99–108.
- Maciejewski, J., Osson, B. & Laffineur, B. (2015) Productions fourragères, p. 210, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- McNair, J.N., Sunkara, A. & Frobish, D. (2012) How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric and semi-parametric methods. *Seed Science Research*, **22**, 77–95.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55–63.
- Nilsson, H.-E. (1995) Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **17**, pp. 154–166.
- Olesen, J.E. & Bindu, M. (2002) Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, **16**, 239–262.
- O'Mara, F.P. (2012) The role of grasslands in food security and climate change. *Annals of Botany*, **110**, 1263–1270.
- Poinsot, D. (2004) *Statistiques Pour Statophobes*, p. 142, Rennes.
- Powell, A.A. and Matthews, S. (2012). Seed aging/repair hypothesis leads to new testing methods. *Seed Technology*, **34**, 15-25
- Raftery, A.E., Zimmer, A., Frierson, D.M.W., Startz, R. & Liu, P. (2017) Less than 2 °C warming by 2100 unlikely. *Nature Climate Change*, advance online publication, p. 7.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. & Job, D. (2012) Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 507–533.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2017.
- R Core Team *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, 2014); <http://www.R-project.org>

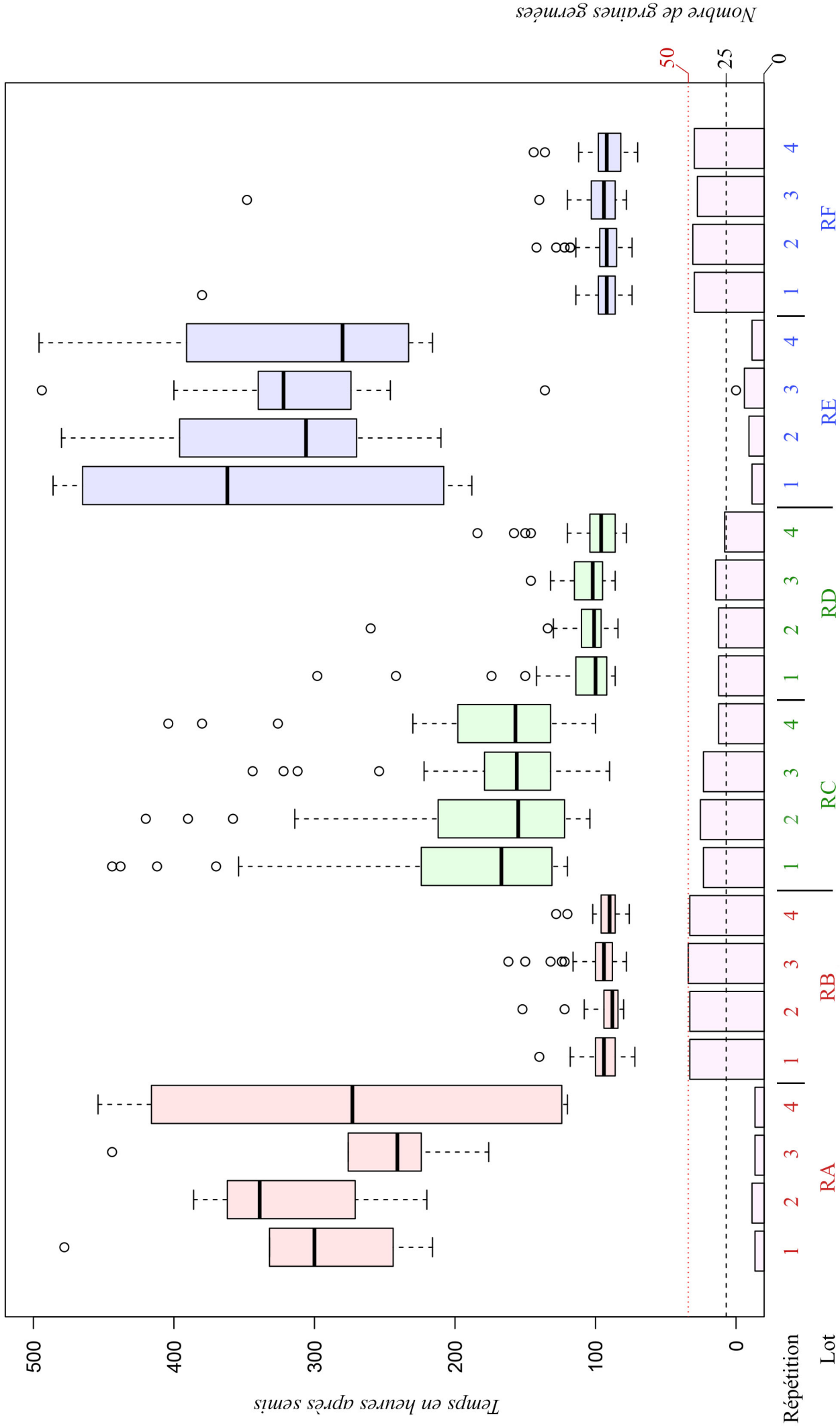
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, **9**, 676–682.
- Sileshi, G.W. (2012) A critique of current trends in the statistical analysis of seed germination and viability data. *Seed Science Research*, **22**, 145–159.
- Slater, T.F., Sawyer, B. & Sträuli, U. (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, **77**, 383–393.
- Wagner, M.-H., Demilly, D., Ducournau, S., Dürr, C. & Léchappé. (2011) Computer vision for monitoring seed germination from dry state to young seedlings. *Seed Testing International*, **142**, 49–51.

Données prolongées de germination des populations de ray-grass anglais - essai à 10°C



Annexe I : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 10°C

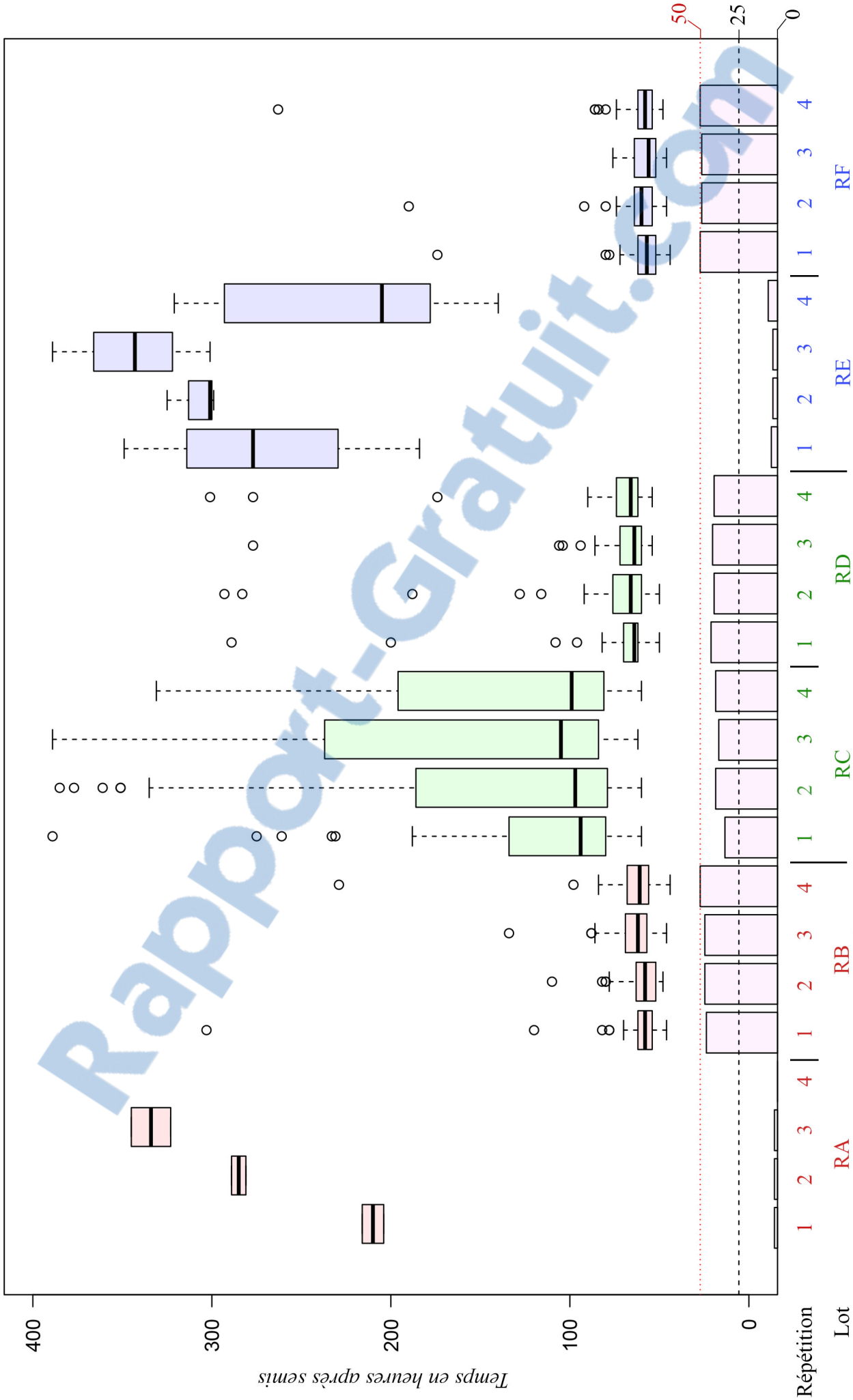
Boîtes à moustaches réalisées sous R à partir des données prolongées



Annexe II : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 15°C


Boîtes à moustaches réalisées sous R à partir des données prolongées

Données prolongées de germination des populations de ray-grass anglais - essai à 21°C



Annexe III : Comparaison des répétitions de l'essai de germination des 6 lots de ray-grass anglais semés à 21°C

Boîtes à moustaches réalisées sous R à partir des données prolongées

	Diplôme / Mention : Master 2 Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) Parcours : Production Végétale Spécialisée (PVS) Option : Semences et plants	
Auteur(s) : Bianchetti Grégoire Date de naissance* : 12/07/1991	Organisme d'accueil : GEVES Adresse : 25 rue Georges Morel, 49070 BEAUCOUZE	
Nb pages : 34 Annexe(s) : 3	Maître de stage : Didier Demilly	
Année de soutenance : 2017	Co-encadrement : Marie-Hélène Wagner	
<p>Titre français : Développement d'une méthode de phénotypage automatisé pour suivre la germination de graminées – Comparaison de la réponse germinative à la température de populations sauvages de ray-grass anglais</p> <p>Titre anglais : Development of an automated phenotyping method for the monitoring of grasses germination – Comparison of the heat germinative response of wild perennial ryegrass populations.</p>		
<p>Résumé (1600 caractères maximum) :</p> <p>De récents travaux de l'INRA de Lusignan, étudiant l'impact du réchauffement climatique sur les prairies (biome terrestre majeur) ont montré que des populations sauvages de ray-grass anglais (<i>Lolium perenne</i> L.) (herbacée largement cultivée dans le monde pour ses variétés fourragères comme gazonnières), présentaient (1) une forte variabilité dans la réponse germinative à la température et que (2) certains vieux lots de semences germaient mieux aux températures froides. Ces résultats ont conduit en 2015, en partenariat avec l'ACVF et le GEVES, à la création du projet collaboratif (RéGàTe) visant à cribler la réponse germinative à la température des graminées. S'inscrivant dans le cadre de ce projet, cette étude a pour objectif de développer une méthode d'analyse d'images automatisée pour le phénotypage germinatif de graminées sur les bancs de germination du GEVES, afin d'acquérir à haut débit des cinétiques de germination à des températures d'essais homogènes et contrôlées. Les résultats obtenus sur 4 températures, pour des lots anciens et récents de trois populations sauvages de ray-grass anglais ont montré que la méthode développée fonctionne pour 92% des 5000 semences analysées avec une corrélation moyenne de 95% des données de germination acquises par rapport aux comptages visuels, chronophages. Les résultats ont en outre confirmé, chez le ray-grass anglais, (1) l'existence d'une variabilité génétique dans la réponse germinative à la température, exacerbée à 10 et 15°C et (2) que les lots âgés germaient mieux à basse températures ($\leq 15^{\circ}\text{C}$). Permettant au GEVES de suivre automatiquement la germination de ces graminées, cette étude apporte en outre des pistes pour la création variétale et l'amélioration des protocoles de multiplication des ressources génétiques, actuellement réalisée entre 20 et 30°C, températures favorables à l'espèce.</p>		
<p>Abstract (1600 caractères maximum) :</p> <p>Recently researchers from INRA-Lusignan have studied the impact of global warming on grasslands, one of the largest terrestrial biomes. The results showed that some wild perennial ryegrass populations (one of the most exploited grass species for forage and amenity uses), had (1) a high heat germination response variability and that (2) cold temperatures were better for germination of old seed lots. Following on from these results, a partnership was set-up in 2015 between INRA, ACVF and GEVES (project RéGàTe). The aim of this internship project was to develop an automated image analysis method for the germinative phenotyping of grasses on the GEVES germination bench in order to acquire high-throughput germination kinetics at homogeneous and controlled test temperatures. The results obtained at 4 temperatures for old and recent seed lots of three perennial ryegrass wild populations showed that the developed method works for 92% of the 5000 analysed seeds with an average correlation of 95%, when compared with the time-consuming method of visual counting. The results also confirmed, for perennial ryegrass, (1) the variability in heat germinative response is exacerbated at 10 and 15°C, and (2) that the germination of old seed lots was higher at cold temperatures ($\leq 15^{\circ}\text{C}$). The results of this project enable GEVES to automatically monitor the germination of these grasses. This study also provides perspectives for varietal creation and genetic resource multiplication protocols, which are currently carried out at temperatures favourable for the species (20-30°C).</p>		
<p>Mots-clés : Prairies, germination, température, semences, ray-grass anglais, population sauvage, phénotypage automatisé, analyse d'images.</p> <p>Key Words : Grassland, germination, temperature, seeds, perennial ryegrass, wild population, automated phenotyping, image analysis.</p>		