

[HeatWheat] Analyse de la diversité génétique de la réponse au stress thermique via phénotypage fin et génétique d'association

Stéphane Lafarge^{*1}, Gaetan Touzy³, JC Deswarte³, Katia Beauchene³, Laurent Maunas³, Christine Girousse², Jane Roche⁴, Agnès Piquet², Said Mouzeyar⁴, Jacques Le Gouis²

1 - Biogemma, Centre de Recherche de Chappes, F-63720 Chappes.

2 - INRA-UBP, UMR1095 Genetic, Diversity & Ecophysiology of Cereals, F-63100 Clermont-Ferrand.

3 - ARVALIS-Institut du végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin F-75116 Paris

* **Coordinateur** : Stéphane Lafarge, stephane.lafarge@Biogemma.com

1. Introduction

La stagnation du rendement constatée chez le blé depuis les dix dernières années est fortement corrélée à des épisodes climatiques. Lobell et al. (2011) ont chiffré l'impact du stress thermique à une perte mondiale de rendement de 5.5%, soit une perte totale de 35 M de tonnes. En Europe, des études ont été menées (Semenov et al. 2010 ; Gouache et al. 2012) ; l'analyse de l'évolution climatique ainsi que celle des rendements lors des vingt dernières années met en évidence une augmentation de l'impact du stress thermique en Europe sur les cultures de blé (Brisson et al. 2010). Les pertes de rendement en blé en Europe seront probablement plus importantes suite à des stress thermiques que suite à des déficits hydriques estivaux, qui seront évités du fait d'une maturation plus précoce des blés (Semenov et Shewry, 2011). Il reste cependant à clairement identifier les types de stress les plus courants en France en fonction de la spécificité des régions.

Ces données doivent orienter la recherche vers une compréhension des mécanismes de résistance et de sensibilité des variétés à ce type de stress, à une identification de matériel pertinent pour la sélection et d'outil moléculaire pour le suivi des allèles favorables dans le germplasm. Ce renforcement du germplasm français en allèles de tolérance aux futurs épisodes climatiques permettra d'améliorer la stabilité des rendements sous contraintes abiotiques et de répondre aux besoins de production en prenant en compte les nouvelles contraintes liées aux variations climatiques.

Sur le plan international, l'investissement sur la recherche d'une adaptation aux températures élevées du blé existe (Ortiz 2008 ; Reynolds 2007 ; Cossani 2012 et Reynolds 2012). Des études montrent que le blé est sujet fréquemment à des stress thermiques dans sa période de floraison et de remplissage du grain (Stone et Nicolas 1994). Durant la période reproductive ce genre de stress a un impact direct sur la fertilité et les composantes du rendement (Wollenweber et al. 2003). L'impact sur la capacité de fécondation est important si le stress se situe lors de la floraison (stérilité pollinique, avortement des grains etc...) (Tashiro et Wardlaw 1990). L'impact d'un stress lors du remplissage du grain se caractérise par un impact sur la volumétrie du grain (poids, taille) et sur sa composition (Calderini et al. 1999). Des traits physiologiques à travailler en sélection ont donc été identifiés pour une sélection spécifique de la résistance aux fortes températures, notamment lors du remplissage (Reynolds et al. 2007, Cossani et al. 2012), notamment la température de la canopée et la mesure de la concentration en sucres solubles. Des QTL pour certains de ces traits adaptatifs ont été identifiés (Suzuky Pinto et al. 2010). Des études physiologiques comparatives ont été menées sur différents génotypes présentant des réponses au stress différentes (Dhyani et al. 2013). Elles mettent en évidence des différences tant au niveau physiologique que métabolique. La

mise en place d'un protocole de stress en conditions contrôlées et l'analyse d'un groupe de variétés sélectionnées permettrait d'accélérer l'identification de génotypes résistants au stress thermique et de ce fait, leur utilisation en sélection.

Des approches de génétique quantitative ont aussi été menées et des QTL ont pu être détectés (Suzuky-Pinto et al. 2010, Bennett et al. 2012, Rebetzke et al. 2013, Bonneau 2013). L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence des zones du génome liées à la résistance au stress thermique, notamment les zones situées sur les chromosomes 1B, 2B, 3B, 4A, 6B et 7A/B confirmant leur valeur générique sur ce type de contraintes.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ces mécanismes et dans l'identification des facteurs génétiques impliqués dans la sensibilité/résistance au stress thermique, des ressources génomiques sont aussi disponibles comme des données d'expression sur le blé (Qin et al. 2008). Ceci a amené une meilleure compréhension sur les gènes potentiellement impliqués dans la réponse au stress thermique (Mittler et al. 2012) notamment avec l'implication de la famille des Heat Shock Factor (HSF) (Liu et al. 2013).

Au bilan, il existe dans la littérature de nombreux éléments sur l'impact du stress thermique chez blé. Cependant, les stress appliqués sont généralement des stress aigus et les variétés utilisées ne permettent pas d'imaginer une utilisation rapide en sélection en France. De ce fait, HeatWheat avait pour objectif d'identifier les sources potentielles de résistance au stress thermique dans le matériel à disposition du sélectionneur et aussi de créer des outils permettant une caractérisation variétale fine par utilisation de marqueurs moléculaires.

2. Matériel et méthode

2.1 - Bilan agro-climatologique et disponibilités des données historiques

Une étude préliminaire a été menée pour tenter d'identifier, dans des données expérimentales de plein champ, des situations où un stress thermique a eu lieu, afin de qualifier la séquence climatique responsable de la perte de rendement. Les données d'un essai de type « observatoire » ont donc été mobilisées. Les éléments à disposition étaient : données météorologiques journalières (températures min/max, précipitations, rayonnement), composantes de rendement (rendement grain, densité d'épis, PMG, indice de récolte), stades (épi 1 cm, épiaison, floraison) et caractérisation sommaire du sol. L'essai retenu sur la base d'une identification *a priori* par un agronome de terrain était conduit en 2005, sur le plateau du Neubourg (Eure), sur un sol de limons profonds. 4 variétés de précocités différentes étaient suivies pour leur phénologie et l'élaboration du rendement. La séquence climatique observée en 2005 en Haute-Normandie a ensuite été

comparée à d'autres situations pour valider le lien entre température et altération des composantes.

Une analyse agro-climatique nationale a ensuite été réalisée pour qualifier les conditions thermiques et hydriques dans lesquelles a lieu la phase de remplissage des grains du blé tendre en France. Pour cela, les données météorologiques de 232 stations météorologiques ont été exploitées ; ces stations présentaient des données sur la période 1994-2013 et étaient situées à une altitude inférieure à 500m. Pour décrire précisément les conditions climatiques impactant les cultures, des indicateurs phénoclimatiques ont été calculés : chaque station météorologique était rattachée à un cas-type (précocité variétale et date de semis), et un modèle phénologique était utilisé pour calculer des stades clés (stade épi 1 cm, floraison, maturité physiologique). Les indicateurs retenus sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous. La simulation consistait à déterminer pour chaque station une valeur moyenne par indicateur (pas de détermination de la variabilité interannuelle). Une analyse en composantes principales suivie d'une classification hiérarchique ascendante ont permis d'identifier des groupes de stations présentant les mêmes tendances phénoclimatiques. Pour chaque groupe, une station représentative a été identifiée, et fait l'objet d'analyses complémentaires (analyse de données horaires lors de séquences climatiques historiques).

Critère	Paramètre	Seuil	Période de calcul
Tmax	nombre	>25°C	floraison-maturité
Tmin	nombre	>15°C	floraison-maturité
Tmax	cumul	>25°C	floraison-grain laiteux
Tmax	cumul	>25°C	grain laiteux-maturité
Tmax	date du 1 ^{er} évè.	>25°C	épi 1cm-maturité
ETP	nombre	>5mm/j	floraison-maturité
ETP	nombre	>7mm/j	floraison-maturité
Tmax	nombre	>25°C	6 créneaux consécutifs de 150°Cj entre Z65-300°Cj et Z65+600°Cj
TMin	nombre	>15°C	6 créneaux consécutifs de 150°Cj entre Z65-300°Cj et Z65+600°Cj
ETP	cumul		floraison-maturité
P-ETP	cumul		épi 1cm-floraison
P-ETP	cumul		floraison-maturité

Tableau 1 : liste des indicateurs retenus

2.2 - Analyse de la diversité génétique en conditions contrôlées

Le matériel génétique utilisé est le panel BreedWheat composé de 200 lignées de blé hiver élites inscrites dans la période 2000/2012. Celui-ci a été phénotypé en conditions contrôlées en différenciant une modalité de fortes températures (« heat stress ») à une modalité témoin, selon le protocole suivant : chaque plante devant subir un stress thermique était placée dans un compartiment stressant 3 jours après floraison pour une durée de 10j, puis était remise en condition optimale pour le reste du cycle.

Chaque génotype était représenté par 6 plantes en pot individuel avec 3 plantes en conditions optimales pour l'ensemble du cycle et 3 subissant le stress thermique comme indiqué ci-dessus. L'ensemble du dispositif représente 1200 plantes implantées en split-plot dans un compartiment de serre. Un second compartiment est utilisé pour la condition stressante.

En terme de phénotypage, pour chaque plante ont été mesurés notamment : la date de floraison du brin maitre, le contenu en

chlorophylle par Dualex (Force-A, Orsay, France) (une fois par semaine avec cinq mesures sur la feuille drapeau). En fin d'expérimentation, la récolte a été effectuée sur le brin maitre et sur les talles de façon séparée et le nombre d'épis compté. Pour l'épi du brin maitre et ceux des talles, les grains récoltés ont été comptés et analysés pour déterminer les longueur/ largeur/ surface. Les grains pesés ont permis de calculer le PMG.

Deux années d'expérimentations ont été réalisées sur les sites de Montardon (Arvalis) et Chappes (Biogemma) permettant ainsi de générer un jeu de données phénotypiques pour la génétique d'association.

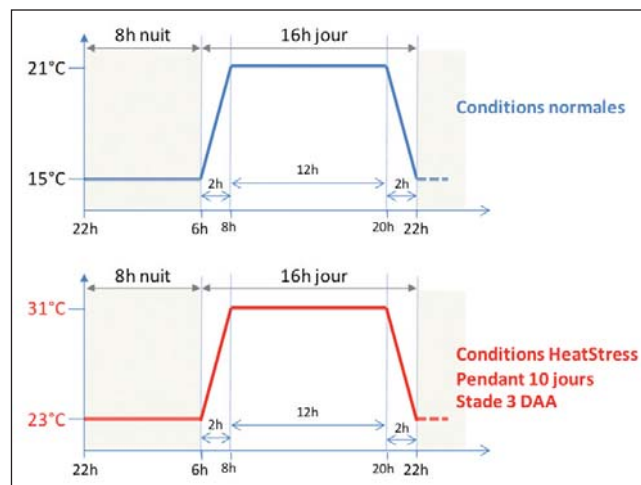


Figure 1 : Représentation des cycles en condition optimale et stress thermique

2.3 - Génétique d'association (GWAS)

Les données de génotypage utilisées sont ceux issus de la puce Affymetrix Axiom 420k produites dans le cadre du projet BreedWheat (ANR-2010-BTBR-03). Seuls les SNP polymorphes ont été utilisés dans cette analyse. Tous les SNP ont été physiquement cartographiés sur la séquence de référence du génome de Chinese Spring RefSeq V1.0 (IWGS et al. 2018). Les locus hétérozygotes ont été considérés comme des données manquantes. Les SNP monomorphes, les SNP avec plus de 10% de données manquantes et les SNP avec une fréquence d'allèle mineure (MAF) inférieure à 5% ont été écartés. Au final 219k SNPs ont été utilisés dans les modèles d'association décrits ci-dessous.

Les mêmes modèles expérimentaux ayant été utilisés dans les deux années d'expériences, nous avons donc décidé d'utiliser la même base pour modéliser l'interaction génétique par traitement (GxT). Le modèle de base a été adapté à l'aide d'un modèle mixte écrit en R utilisant le package ASReml-R (Butler et al. 2009). L'interaction GxT a été déclarée comme suit :

$$Y_{ijkl} = \mu + R_j + Tk + Tk(R_j) + Bl(R_jTk) + Gi + Gi \times Tk + \epsilon_{ijkl}$$

Pour une analyse combinée des 2 années d'essais, le modèle suivant a été utilisé :

$$Y_{ijkl} = \mu + Am + Tk + Tk \times Am + Am(R_j) + Tk(AmR_j) + Bl(AmR_jTk) + Gi + Gi \times Tk + Gi \times Am + \epsilon_{ijkl}$$

2.4 - Phénotypage physiologique et moléculaire

En complément du phénotypage effectué à l'échelle de la plante entière en serre, il a été proposé d'effectuer une expérimentation spécifique en chambre de culture, afin d'obtenir un phénotypage fin à l'échelle du grain avec des approches écophysiological et transcriptomique. Ont donc été retenus 2 génotypes, contrastés pour leur tolérance aux températures élevées post-anthèse, de manière à identifier des mécanismes potentiels de tolérance/sensibilité au stress thermique lors du

développement du grain et des gènes majeurs impliqués dans ces mécanismes.

Sur la base de l'évaluation de la diversité génétique réalisée en conditions de serre, deux génotypes contrastés pour leur réponse aux températures élevées post-anthèse ont été sélectionnés : Altigo, classé comme résistant et Attilas classé comme sensible. Ces deux génotypes présentent des dates de floraison similaires et des PMG en conditions témoins proches ; cette classification a été confirmée par les tests réalisés au stade plantule de CMT (Cell membrane thermostability).

Après semis et vernalisation (8 semaines à 5°C), 128 plantes par génotype ont été conduites jusqu'à floraison en conditions contrôlées (21/15°C jour/nuit ; 16/8h de photopériode ; arrosage non limitant par solution nutritive). A floraison, sur chaque plante, des épis homogènes en termes de nombre d'épillets ont été repérés et la date de floraison des florets des épillets centraux de ces épis notée. Le stade de développement des grains a été calculé en temps thermique (°Cd, base 0°C) à partir de cette date de floraison. Deux jours après floraison, la moitié des plantes de chaque génotype a été transférée en conditions de températures élevées (31/25°C jour/nuit soit une température moyenne journalière de 29°C) pendant environ 250°Cd, correspondant approximativement à la fin de la phase précoce de développement des grains. Les plantes restantes ont été laissées en conditions témoins (21/15°C jour/nuit soit une température moyenne journalière de 19°C). Ces conditions de stress sont identiques à celles appliquées en serre (expérimentation sur la diversité génétique). Pour chaque génotype et chaque traitement thermique, selon leur utilisation entre 5 et 12 épis ont été prélevés à différents stades de développement pour les analyses écophysiological et transcriptomique.

Pour l'analyse morphométrique des grains, pour chaque génotype/condition thermique, 5 épis ont été prélevés et par épi les 2 grains basaux de l'épillet central à 10 stades de développement (0, 80, 120, 180, 220, 300, 500, 600, 700, 800°Cd). Pour tous les stades, la masse sèche des grains a été mesurée (d'autres variables caractérisant la croissance dimensionnelle et l'évolution hydrique du grain ont été mesurées mais seuls les résultats de croissance en masse sèche sont détaillés ici) ; au stade 300°Cd (en sortie de stress thermique et début de la phase de remplissage au sens strict), les grains ont été disséqués en vue d'isoler l'albumen et d'en dénombrer les cellules (estimateur de la force de puits des grains). Pour chaque génotype et traitement thermique, les cinétiques de croissance en matière sèche ont été ajustées par une fonction de croissance (logistique 3 paramètres) permettant d'extraire les paramètres caractéristiques de croissance des grains (valeurs maximales, vitesse et durée des processus).

L'analyse transcriptomique a été réalisée sur 3 répétitions biologiques prélevées par génotype/stade/condition ; et à 6 stades de développement du grain de blé (0, 80, 120, 180, 220 et 500°C.d). L'expression de 40 gènes a été suivie en qRT-PCR à tous les stades, pour les 2 génotypes, pour les 2 conditions. Ces 40 gènes ont été sélectionnés dans la littérature comme répondant à l'élévation de températures. En outre, des résultats antérieurs laissaient supposer que l'effet des températures élevées s'exprimait en priorité sur le métabolisme carboné. Aussi, 2 groupes de gènes ont été sélectionnés : l'un sur le métabolisme carboné et l'autre sur des voies de signalisation permettant de définir des gènes marqueurs de stress thermique potentiellement liés au niveau de tolérance au stress thermique. Les réactions de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) ont été réalisées sur la plateforme de génotypage à haut débit GENTYANE (UMR 1095 GDEC, <http://gentyane.clermont.inra.fr>). La distribution du mix de réaction dans les plaques qPCR 384 puits a été effectuée à l'aide du robot Microlab Hamilton Star puis la réaction de RT-qPCR

a été réalisée dans un thermocycleur LightCycler Roche LC480 selon le programme donné par les recommandations de l'appareil. Toutes les réactions ont été réalisées en duplicata.

Trois gènes de ménage ont été testés (Ta2776, Ta2291 et Ta54227 tirés de la publication de Paolacci et al. 2009). Parmi eux, le gène Ta2291 a été choisi pour normaliser les données de RT-qPCR entre plaques car son niveau moyen d'expression était similaire à ceux des gènes testés et qu'il n'est pas impacté par l'application d'un stress abiotique (Paolacci et al. 2009). L'expression relative des gènes d'intérêt a été déterminée selon la méthode 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak et Schmittgen, 2001).

Enfin, des amorces permettant l'amplification d'une séquence intronique du gène Protéine Disulfide Isomérase (PDI) chez le blé (Paolacci et al, 2009) ont été utilisées afin de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. Une analyse en composantes principales a été réalisée à l'aide des données d'expression normalisées de l'ensemble des 40 gènes de tous les échantillons et du package R ggfortify (Tang et al. 2016). Pour chaque gène, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (homoscédasticité non respectée) a été réalisé pour mettre en évidence les différences entre les moyennes des échantillons.

3. Résultats

3.1 - Bilan agro-climatologique et disponibilités des données historiques

Les composantes de rendement mesurées en 2005 sur l'essai près du Neubourg (Eure) sont présentées ci-dessous :

Cv	Z55	Rend.	PMG	Dens Ep	Grains / épi	IR
Apache	21-mai	87.0	41.8	534	39	0.45
Caphorn	23-mai	101.6	40.7	500	50	0.48
Shango	18-mai	75.8	32.6	489	48	0.36
Soissons	30-mai	86.7	38.5	544	41	0.44

Tableau 2 : liste des composantes retenues. Rendement en q/ha, exprimé à 15% de teneur en eau ; PMG en g ; Densité d'épis en épis/m².

On peut donc constater un écart significatif de rendement final, avec notamment une forte variation du PMG et de l'indice de récolte, et ceci malgré des biomasses totales élevées. La variété la plus impactée semble être Shango, qui s'avère également être la plus tardive. Sur ce site, une séquence chaude est apparue au cours de la seconde moitié du mois de juin (coïncidant avec le stade Grain Laiteux de la variété la plus tardive), avec des températures maximales dépassant ponctuellement 30°C. Il est donc supposé que cet événement chaud tardif soit à l'origine des comportements différenciés au sein de cet essai, et notamment l'altération des composantes de rendement de la variété la plus tardive.

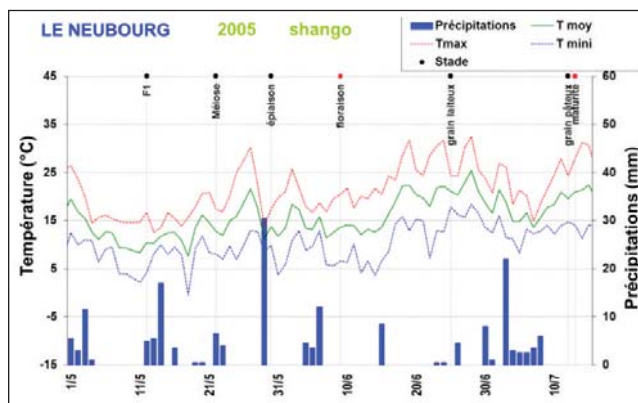


Figure 2 : Evolution des paramètres climatiques au cours du cycle

Des conditions climatiques similaires ont été recherchées dans d'autres secteurs géographiques, afin d'explorer le comportement des cultures dans de telles situations. Un essai a été identifié en 2005, dans le département de Seine-et-Marne (77). Les températures relevées (Tmax et Tmin) sur ce second site ont été effectivement plus élevées autour du stade Grain Laiteux, avec notamment un pic à 35°C.

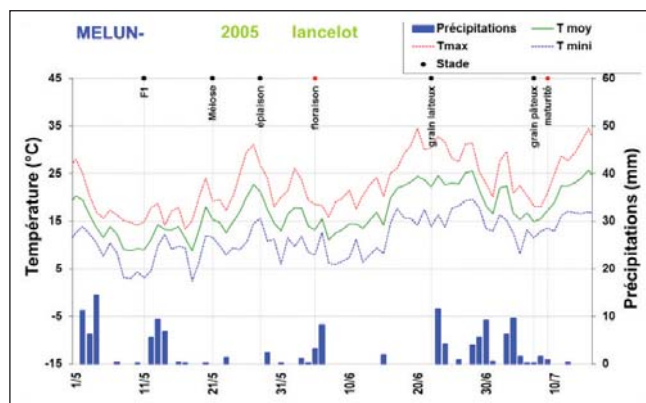


Figure 3 : Evolution des paramètres climatiques au cours du cycle

Les composantes de rendement mesurées dans l'essai ne présentent pas d'altération nette selon la précocité (variété ou date de semis).

Cv	Date sem.	Z55	Rend.	PMG	Dens Ep	Grains / épi	IR
Apache	D2	22-mai	98.9	39.0	814	31.2	0.49
Apache	D3	25-mai	92.6	36.4	826	30.8	0.49
Caphorn	D2	24-mai	105.5	39.6	634	42.0	0.52
Caphorn	D3	27-mai	100.5	38.4	591	44.3	0.53
Lancelot	D1	25-mai	95.3	39.1	634	38.4	0.45
Lancelot	D2	28-mai	91.1	33.1	708	38.9	0.46

Tableau 3 : liste des composantes obtenues. Rendement en q/ha, exprimé à 15% de teneur en eau ; PMG en g ; Densité d'épis en épis/m².

Il semble donc qu'il n'est pas possible de définir un lien stable entre l'occurrence d'une séquence chaude et une pénalisation du PMG, toutes variétés confondues. L'absence de constance de réponse à des températures supérieures à 30°C laisse supposer qu'un déterminisme multifactoriel est à l'origine de l'altération du fonctionnement de la plante en fin de cycle, ou que les variétés se comportent de manière très différente (Shango non présent dans l'essai en Seine-et-Marne) ?

La classification ascendante hiérarchique basée sur l'analyse de valeurs moyennes par station a permis d'identifier 5 groupes climatiques définis par des critères thermiques et hydriques autour du remplissage, et représentant des scénarii distincts pour l'élaboration du rendement.

Sc.	Caractéristiques phénologiques et climatiques
1	Arrivée tardive à Z30, montaison et remplissage plus rapide; moyennement échaudant, mais Tmin élevées; bilan hydrique plutôt favorable
2	Précocité médiane; températures chaudes rencontrées précocement dans le cycle; alimentation hydrique plutôt bonne
3	Précocité médiane, peu de températures élevées ; conditions plutôt sèches
4	Phénologie précoce permettant de l'échappement ; occurrence forte de journées à ETP élevée ; déficit en eau pendant dès montaison; températures nocturnes pas trop élevées
5	Phénologie plutôt tardive avec montaison et remplissage longs, peu de températures élevées, peu d'ETP élevées; éventuellement un peu sec en montaison

Tableau 4 : liste des 5 scénarii identifiés

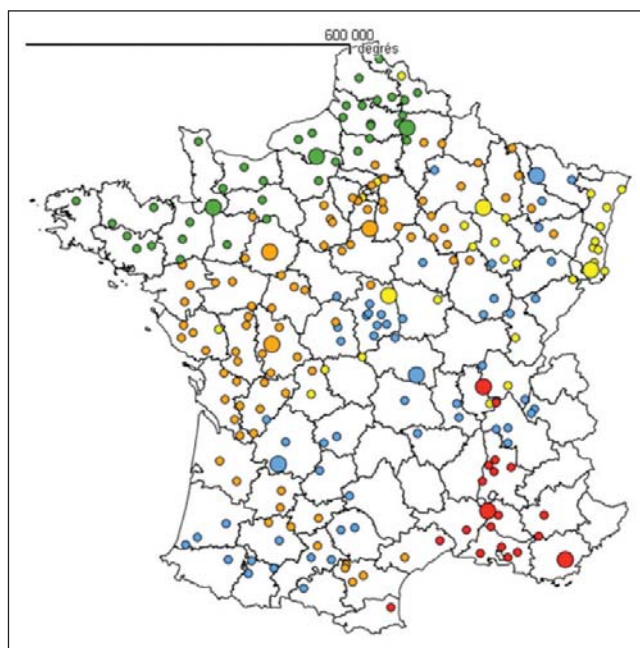


Figure 4 : Positionnement des stations météorologiques étudiées, réparties en 5 scénarii climatiques

Pour chacun de ces groupes, un parangon a été identifié et a permis de mieux préciser les conditions climatiques de fin de cycle ; pour cela, les critères climatiques ont été calculés sur 20 campagnes cultures (récoltes 1994 à 2013). De plus, des données horaires ont été mobilisées lorsqu'elles étaient disponibles.

Pour le scénario 4 (caractérisé par sa précocité et des demandes évaporatives élevées), le parangon retenu est la station de Misérioux (Ain). Plusieurs éléments ont été analysés :

- Les valeurs de températures minimales lors de journées « échaudantes » (par convention, journée où Tmax > 25°C) s'avèrent plus élevées.
- Les ETP lors de ces mêmes journées sont en moyenne de près de 6mm/j et peuvent dépasser 7 voire 8 mm/j
- Les séquences où les Tmax dépassent 25°C sont souvent courtes : dans près de 50% des cas, il s'agit d'une journée isolée ou de 2 jours consécutifs. Les événements longs restent peu présents lors du remplissage sur la période étudiée.

Pour le scénario 5, caractérisé par un cycle long et des conditions peu stressantes, le parangon retenu est la station du Neubourg (Eure). Les données horaires collectées en 2005 pendant la phase de remplissage des grains d'un essai supposément touché par un stress thermique ont présentés les caractéristiques suivantes :

- Des amplitudes journalières qui peuvent atteindre 15 à 20°C
- Des hausses de température horaires qui peuvent atteindre 4°C pendant les premières heures du jour
- Des températures supérieures à 25°C qui se maintiennent, pendant les journées les plus chaudes, pendant 8 à 11h consécutives
- Des niveaux de VPD très limités malgré les températures : entre 0 et 2 kPa.

3.2 - Analyse de la diversité génétique en conditions contrôlées

Lors du stress thermique appliqué à chaque plante 3 jours après l'anthesis, aucun impact significatif du traitement sur la période de floraison n'a été observé dans les expériences de 2016 et 2017. En revanche, un léger effet du traitement a été observé sur le nombre d'épi par plante. Le nombre de graines n'a pas été affecté sur le brin maître, mais a été affecté sur les talles: légèrement en

2016 avec un indice de stress (IS) de 8,3% ($0,05 < \text{valeur-P} < 0,1$) et fortement en 2017 avec un IS à 13,9% ($0,001 < P\text{-value} < 0,01$). Le traitement par stress thermique a un impact sur la morphologie du grain dans les deux expériences, peu importe si le grain a été mesuré sur le brin maître ou sur les autres talles. Pour le PMG du brin maître, la moyenne était de 46,8 g et de 42 g dans le traitement optimal alors qu'elle était de 34,9 g et de 32,9 g dans le traitement optimal et stressé en 2016 et 2017, respectivement. Le traitement thermique affecte le PMG du brin maître de 25,7% et 21,9% en 2016 et 2017, respectivement. En ce qui concerne le maintien du *stay-green*, seuls les axes X du point d'inflexion (XPI) et fin de la sénescence en 2016 étaient significativement affectés. L'ensemble de ces résultats montre que le stress obtenu est bien celui attendu : durant le remplissage, car sans modification (ou très faible) du nombre de grains par épi et une réduction significative du PMG. Nous disposons donc d'un jeu de phénotypique adéquat pour une utilisation en GWAS.

La décomposition de la variance a révélé des interactions GxT significatives pour le PMG, la surface des grains, la longueur et la largeur. Peu importe si elle a été mesurée sur le brin maître ou sur des talles en 2016 ou en 2017. L'interaction GxT était la plus importante pour le PMG et la largeur du grain sur le brin maître, représentant respectivement 22,4 et 25,6% de sa variance génétique en 2016 et 2017.

Ce jeu de données phénotypiques a aussi permis d'identifier 18 variétés contrastées (9 résistantes (en rouge dans le graphique ci-dessous) et 9 sensibles (en bleu)) qui ont été utilisées pour une validation aux champs en 2018 sur 6 lieux.

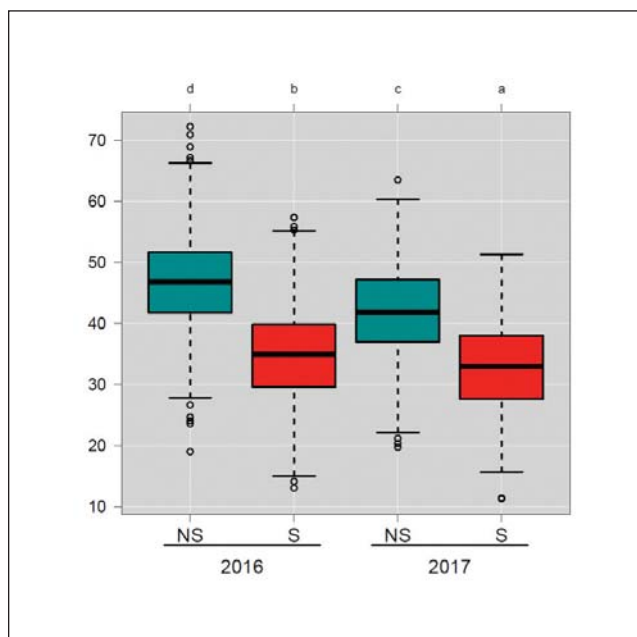


Figure 5 : Boxplot du PMG en condition optimale (NS) et stressée (S) sur les expérimentations 2016 et 2017

Malheureusement, les conditions climatiques de l'année 2018 n'ont pas permis d'obtenir des essais avec une contrainte thermique aux champs et ont ainsi rendu impossible la conclusion sur cette classification réalisée en conditions contrôlées.

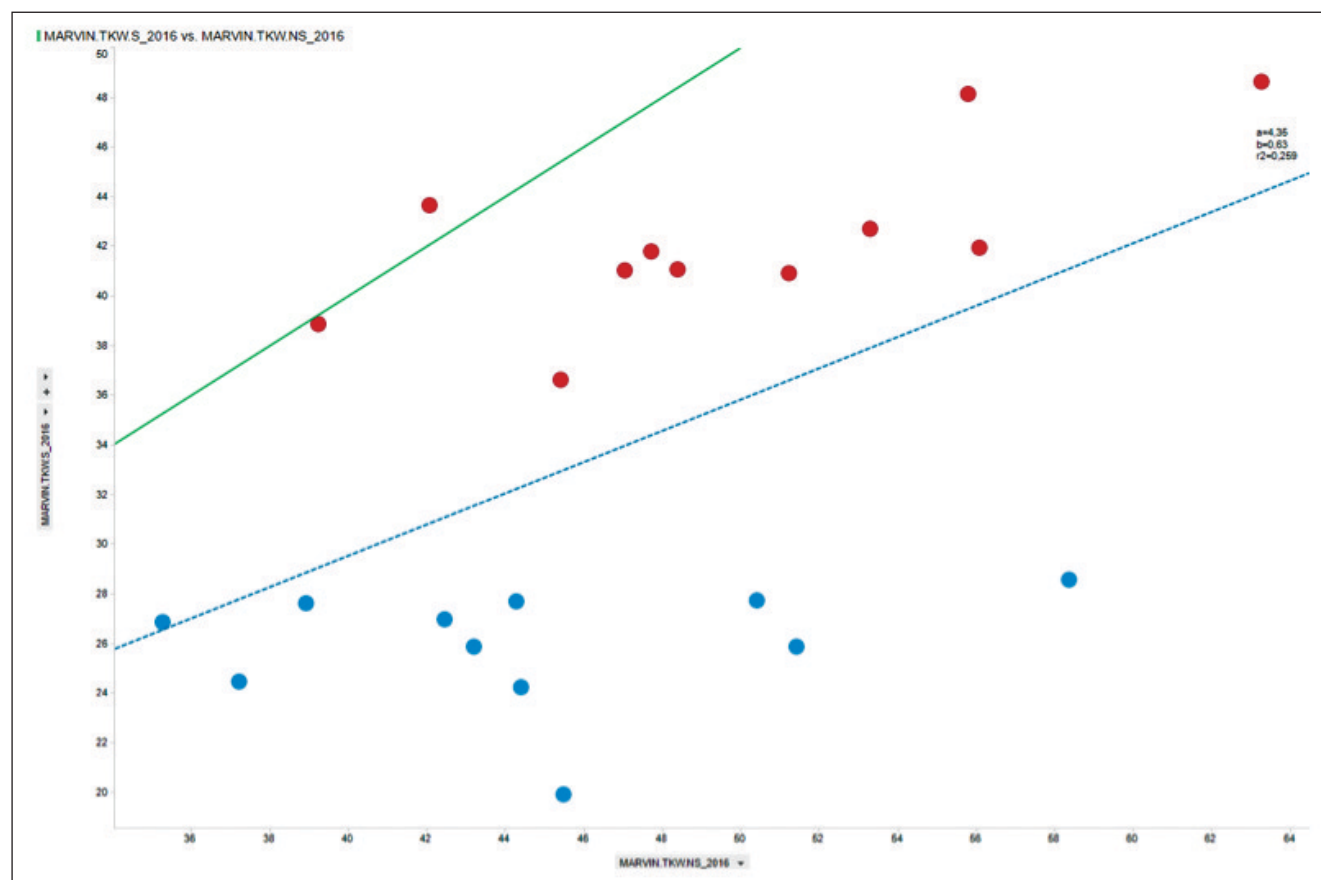


Figure 6 : Données des PMG en conditions optimales (NS) ou stressées (S) pour les 18 génotypes (rouge/tolérant ; bleu/sensible) lors de l'expérimentation 2016

3.3 - Génétique d'association

Au final 219k SNP ont été traités en GWAS sur 24 caractères regroupant des traits agronomiques (floraison, PMG, longueur/largeur des grains) et des traits physiologiques liés à la sénescence (contenu en chlorophylle, *stay-green*, vitesse de sénescence etc...). Les résultats d'association sont donc disponibles sous les 2 modèles : effet du SNP et interaction SNP x Traitement et est visualisable notamment sous forme de Manhattan Plot (Figure 7). Concernant le nombre de SNP associés, on peut noter :

- Effet SNP : 448 associations significatives SNP/Traits représentant 361 SNPs uniques

Trait	SNP/trait association
DOF	72
Grain.Area	2
Grain.Length_TALLES	1
Grain.Width	3
MARVIN.GW	33
MARVIN.GW_TALLES	31
MARVIN.NBSEEDS	22
MARVIN.NBSEEDS_TALLES	10
MARVIN.TKW	3
MARVIN.TKW_TALLES	22
SEN.a	13
SEN.D	2
SEN.END	18
SEN.fEND	1
SEN.START	2
SEN.VIT	1
SEN.XPI	5

Tableau 5 : tableau de relation traits et nombre de SNPs associés

- Effet interaction SNP x Traitement : 196 associations significatives SNP/Traits x Traitement représentant 103 SNPs uniques :

Trait	SNP/trait association/Traitement
Grain.Area	35
Grain.Area_TALLES	8
Grain.Length	26
Grain.Length_TALLES	9
Grain.Width	11
Grain.Width_TALLES	4
MARVIN.GW_TALLES	1
MARVIN.TKW	30
MARVIN.TKW_TALLES	7
SEN.a	1
SEN.D	8
SEN.fEND	7
SEN.r	7
SEN.XPI	4
SEN.YPI	2
AUCK	36

Tableau 6 : tableau de relation traits et nombre de SNPs associés

Un regroupement des SNP sur la base du déséquilibre de liaison (DL) a été effectué afin de définir 41 zones d'intérêts au sein du génome, notamment une positionnée sur le chromosome 4B

L'ensemble de ces marqueurs associés sera une ressource pour la sélection afin de suivre les loci d'intérêt dans le germplasm actuel.

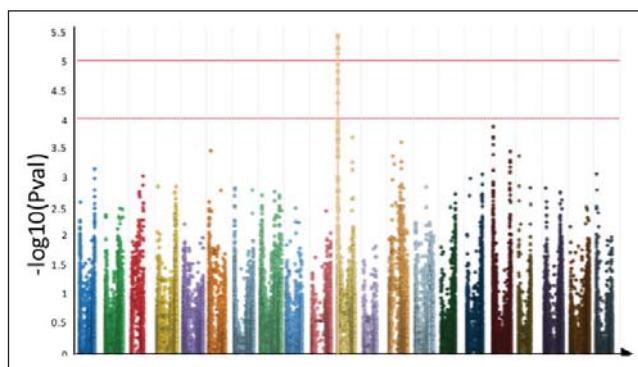


Figure 7 : Manhattan plot des résultats GWAS pour le PMG

2.4 - Phénotypage physiologique et moléculaire

2.4.a - Effets des températures élevées post-anthèse sur la masse finale des grains et sur leurs caractéristiques de croissance (durée et vitesse)

Quel que soit le génotype les températures élevées post-anthèse ont entraîné une diminution statistiquement significative ($P < 0.05$) de la masse finale des grains, respectivement de 11.3 % et 30.7% pour les génotypes Altigo et Attlass (Figure 8).

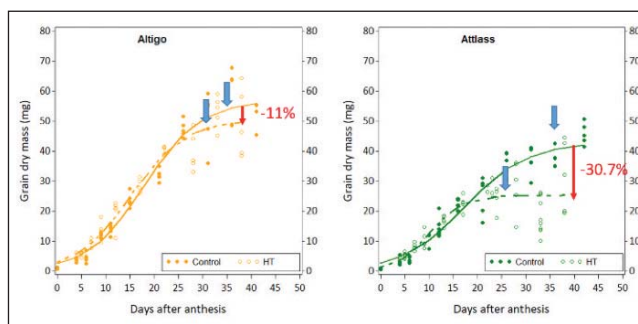


Figure 8 : Effets de températures élevées post-anthèse sur les cinétiques d'accumulation en matière sèche des grains pour les génotypes Altigo (orange) et Attlass (vert). Les points et les cercles représentent les valeurs observées et les lignes continues et brisées les valeurs ajustées par une fonction logistique (3 paramètres). Les valeurs et les flèches rouges indiquent les diminutions de matière sèche finale des grains entre les traitements témoin (C) et températures élevées (HT). Les flèches bleues indiquent pour chaque génotype et chaque traitement thermique les durées d'accumulation de matière sèche dans les grains.

Ces diminutions sont du même ordre que celles observées en conditions de serre pour ces deux génotypes. Ces diminutions ne sont que partiellement liées à l'effet des températures élevées qui ont entraîné une diminution non significative statistiquement de 21.5 % du nombre de cellules maximum dans l'albumen en fin de phase de division cellulaire pour les deux génotypes (Figure 9).

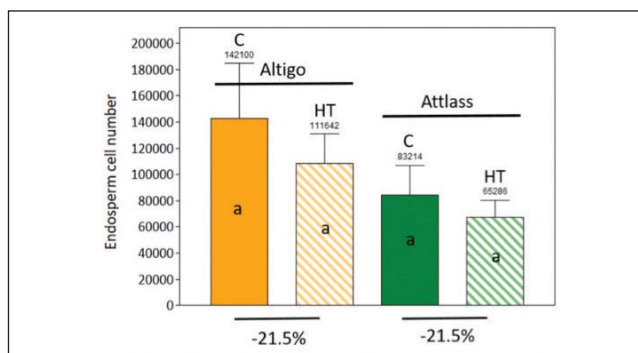


Figure 9 : Effets de températures élevées post-anthèse sur le nombre maximal de cellules dans l'albumen en fin de phase précoce de développement (correspondant à la fin de l'application des températures élevées) pour les génotypes Altigo (orange) et Attlass (vert). C : températures témoins (21/15°C); HT : températures élevées (31/25°C). Les histogrammes représentent les valeurs moyennes \pm écarts-types ($n=5$).

Cette diminution s'est accompagnée de diminutions significatives de la matière sèche des grains dès le stade 180°Cd de 20% et de 27% respectivement pour les génotypes Altigo et Atlass. L'analyse des cinétiques d'accumulation en matière sèche des grains (Figure 8) montre que quel que soit le génotype, les températures élevées ont conduit à une diminution non significative des vitesses moyennes et maximales de ce processus (e.g. respectivement de 6.9% et 2.4 % pour les génotypes Altigo et Atlass pour la vitesse maximale). Les températures élevées ont conduit à une diminution de la durée (exprimée en jours calendaires) de l'accumulation de matière sèche dans les grains, respectivement de 10% (soit environ 4 jours de remplissage) pour le génotype Altigo (différence non significative au seuil 5%) et de 30% (soit environ 10 jours) pour le génotype Atlass (différence significative statistiquement au seuil 5%). Notons que les températures élevées ont des effets similaires sur les autres variables dimensionnelles (diminution des vitesses

des différents processus ; diminutions non significatives voire augmentations significatives des durées pour le génotype Altigo (engendrant une compensation incomplète vitesse/durée) mais diminution systématique des durées pour le génotype Atlass).

2.4.b - Effets des températures élevées post-anthèse sur l'expression des gènes

L'analyse statistique de l'ensemble des données (ACP) (Figure 10) montre que, dans les conditions de stress thermique testées en chambre de culture, l'effet global du stress thermique est négligeable. Seuls les stades 180 et 220°Cd présentent un léger décalage dans l'expression des 40 gènes sélectionnés entre génotype représentant un effet génotype certain.

Les clusters d'expression des gènes (Figure 11) confirment le fait que le comportement des gènes est variable selon les conditions.

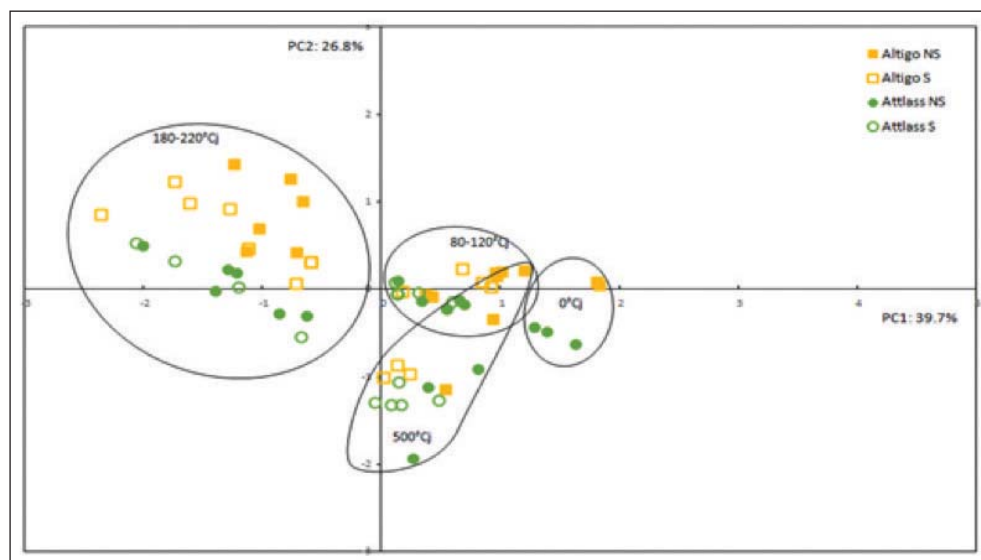


Figure 10 : Analyse en Composantes Principales (ACP) de l'expression des 40 gènes sélectionnés dans le grain du génotype Altigo (tolérant) et Atlas (sensible) en réponse au stress (S) et dans les conditions contrôles (NS) pour les 6 stades de développement du grain (0-80-120-180-220 et 500°Cj)

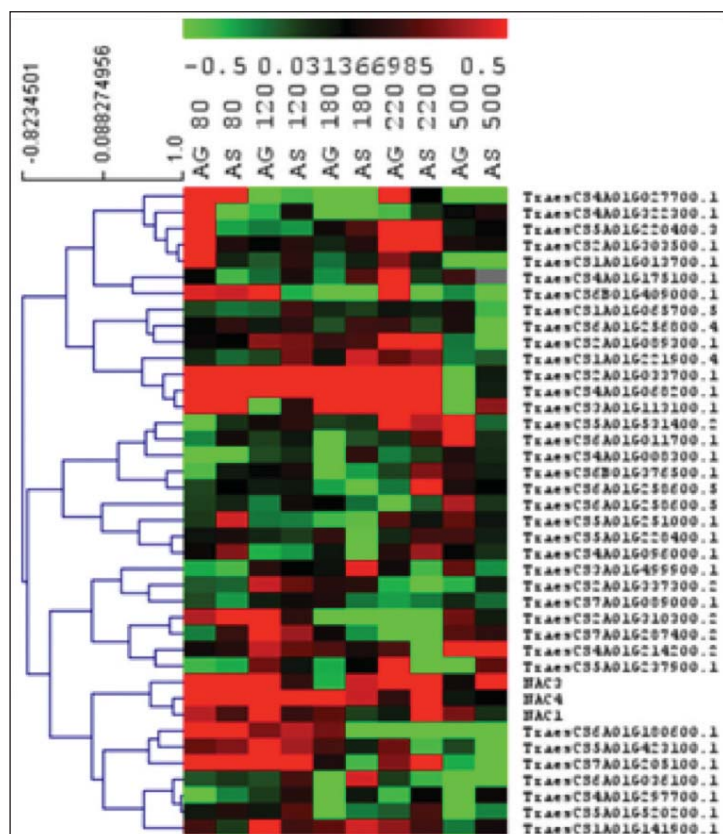


Figure 11 : Clusters d'expression des 40 gènes sélectionnés en fonction du génotype Atlas (AS) et Altigo (AG) et du stade (80, 120, 180, 220 et 500°Cj). Le vert représente un gène sous-exprimé et le rouge un gène sur-exprimé.

Par exemple, l'expression de certains gènes diminue en conditions de stress thermique par rapport aux conditions contrôles comme l'enzyme IIB de ramification de l'amidon (Figure 12A) impliquée dans le métabolisme carboné, qui pourrait être lié à la diminution de la matière sèche (et de volume) du grain observé.

Il apparaît cependant que l'expression d'autres gènes, au contraire, augmente, comme par exemple une protéine induite par l'auxine (Figure 12C). De plus, l'expression du stress est visible principalement dès 180°Cd et à 220°Cd, comme le montre la figure 12B présentant l'expression de HSP90, ou celle de la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (TraesCS7A01G287400), ou encore l'enzyme IIB de ramification de l'amidon à nouveau. Ces données transcriptomiques concordent avec les résultats des données écophysiologicals à l'échelle de l'organe.

Aucune différence nette ne ressort en ce qui concerne la réponse différentielle de l'expression des gènes. Parmi les 40 gènes, deux gènes présentent toutefois une réponse différente selon le génotype : un gène lié à la différenciation cellulaire chez *Oryza brachyantha* RCD1 impliqué dans le manque d'azote

chez les eucaryotes (Okasaki et al. 1998) ; ou encore un gène impliqué dans la voie Ubiquitine Protéasome 26S (comme la F-Box TraesCS6B01G409000.1) qui présente une expression accentuée à 220°Cd sous l'effet du stress thermique qui est différente entre les 2 génotypes (Figure 13A).

De nombreux gènes liés à la signalisation cellulaire avaient été sélectionnés issus de travaux en cours comme par exemple 3 gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle appartenant aux facteurs de transcription de la famille NAC (un exemple est donné pour le TaNAC, TraesCS7A01G194700 ; mais le même profil est obtenu pour les gènes TaNAC TraesCS5A01G245900, TraesCS7A01G569100). Les résultats montrent que leur expression est également différente entre génotypes, particulièrement à 120°Cj, en réponse à la contrainte thermique appliquée. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Girousse et al. (2018) et ceux de Guérin et al. (2019) qui ont montré que ces gènes sont grain-spécifique et fortement impliqués dans le développement du grain en réponse à une contrainte thermique similaire à celle de la présente étude, mais aussi en réponse à un stress de type sécheresse (Figure 12B).

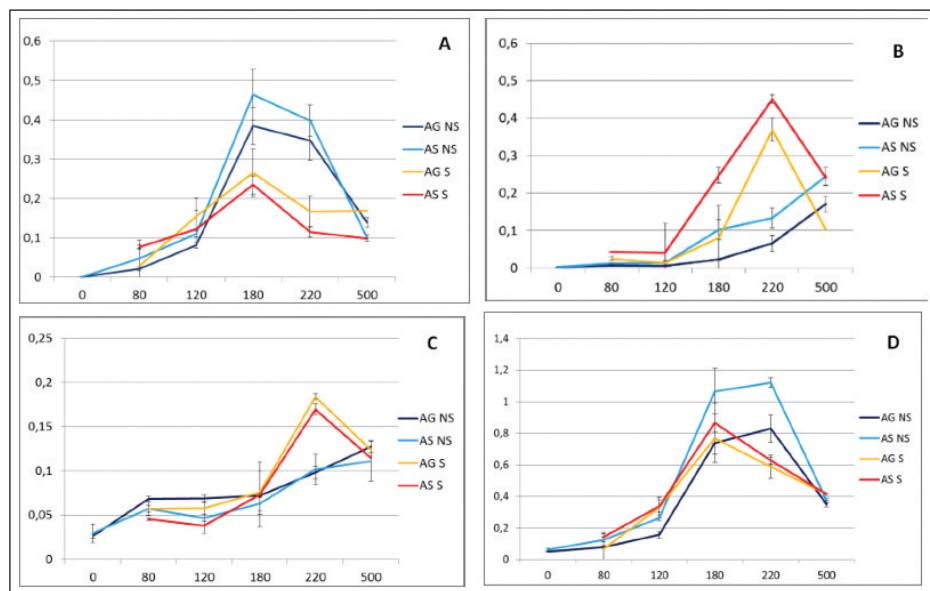


Figure 12 : Cinétique d'expression relative des gènes codant pour (A) l'enzyme IIB impliquée dans la ramification de l'amidon (Starch branching enzyme IIB, TraesCS2A01G310300), (B) une protéine Heat Shock (HSP90, TraesCS2A01G033700), (C) une protéine induite par l'auxine (Auxin-induced protein 5NG4, TraesCS5A01G220400), et (D) la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (TraesCS7A01G287400) en fonction des °C.jours après floraison dans les grains d'Altigo (AG) et d'Atlas (AS) en condition de stress thermique (S)

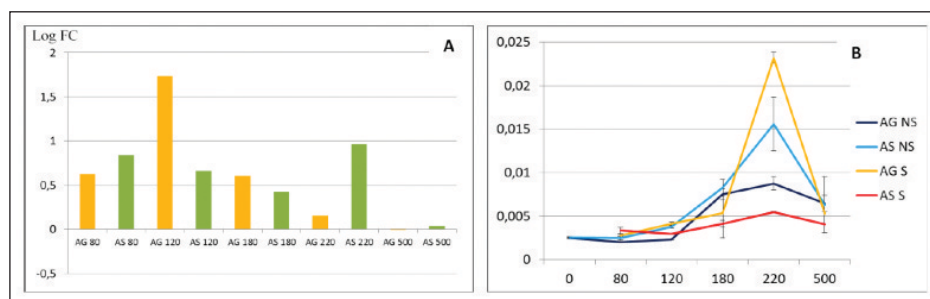


Figure 13 : Log de Fold Change (FC) du ratio d'expression du TaNAC TraesCS7A01G194700 (A) et cinétique d'expression relative des gènes codant une F-Box (TraesCS6B01G409000) (B). AG = Altigo, AS = Atlas, NS = non stressé, S = stress thermique

4. Discussion & Conclusions

Le stress thermique est un stress abiotique difficile à appréhender au champ car il existe peu de méthodes fiables pour piloter un tel stress en extérieur et il est d'autre part difficile d'avoir une condition contrôlée en parallèle sur un site dédié. De ce fait, l'approche d'analyse de données historiques permettant d'identifier des années répondant aux critères de stress thermique et l'utilisation de conditions contrôlées pour générer du matériel et des données phénotypiques a permis de faire avancer les connaissances sur ce stress de plus en plus prévalant en France.

Au niveau des données historiques, l'analyse a permis de mettre en évidence 5 scénarii différents suite au traitement des données phéno-climatiques sur la période 1994-2013, la description fine des 5 classes devrait permettre de mieux analyser les sorties de la classification. Ceci met en évidence la difficulté d'identifier des lieux propices au stress thermique en France, reproductible et permettant de réaliser des essais robustes pour caractériser et mieux étudier ce stress. De ce fait, disposer d'un environnement contrôlé permettant de piloter un tel stress est une nécessité. L'utilisation de simulations phéno-climatiques pourrait par ailleurs apporter 3 informations supplémentaires : la représentativité des conditions expérimentales testées, la co-occurrence de stress climatiques (simultanéité de stress hydriques et thermiques) et l'évolution des conditions de remplissage des grains dans un contexte de changement climatique, avec ou sans adaptation de la phénologie.

La mise en place d'un protocole d'expérimentation pour le pilotage d'un stress thermique en conditions contrôlées a ainsi permis de mettre en évidence une réponse contrastée des lignées testées et de produire des données phénotypiques sur différents caractères d'intérêts. Cette ressource a permis d'identifier des lignées plus résistantes au stress thermique et de ce fait, utilisables en sélection et aussi d'identifier des marqueurs moléculaires liés à la réponse au stress thermique de façon spécifique. En effet, aux champs, il est très difficile de dé-corréler stress hydrique et stress thermique, de ce fait, les conditions en serre nous ont permis d'individualiser ces 2 stress très liés et, ici, d'identifier spécifiquement des loci impliqués dans la réponse au stress thermique. Une méta-analyse avec les données GWAS stress hydrique générées dans le cadre de BreedWheat (Touzy et al. 2019) permet d'identifier ces loci

spécifiques au stress thermique et ceux, à l'inverse, plus généraux de réponse aux stress abiotiques. De plus, le protocole utilisé a ciblé le stade remplissage du grain, il est aussi possible d'adapter ce protocole et de cibler un autre stade, notamment floraison, afin de déterminer les loci similaires et spécifiques de ces 2 stress thermiques différents (même si celui-ci n'est pas (encore) très présent en Europe). Au niveau variétal, 18 lignées ont été sélectionnées pour le caractère discriminant (Sensible/résistant) au stress thermique en conditions contrôlées, celles-ci ont été implantées en 2018 dans un réseau d'essais afin d'évaluer aux champs leur comportement. Malheureusement, l'année 2018 n'a pas été propice au stress thermique (ceci démontrant l'utilité du travail en conditions contrôlées dans la 1ère partie du projet) et ne nous a pas permis de conclure sur la caractérisation de ces lignées.

Une analyse plus fine de ces génotypes contrastés a permis de montrer que, quel que soit le génotype considéré, le stress thermique impacte fortement la croissance du grain diminuant essentiellement la durée d'accumulation de matière sèche dans le grain, en concordance avec l'expression des gènes du métabolisme carboné (gènes du métabolisme de l'amidon en particulier). Ces gènes pourraient servir de marqueurs spécifiques du stress thermique. Toutefois, si à l'échelle du grain (masses et dimensions), l'effet génotypique a pu être mis en évidence, les études transcriptomiques n'ont pas permis de mettre en évidence un effet aussi marqué, cela pouvant être lié au trop faible nombre de gènes étudiés qui a pu être limitant dans cette étude. En particulier, le nombre de gènes sélectionnés au cours de cette étude ne permet pas de rendre compte de la différence de durée d'accumulation de matière sèche (amidon) entre génotypes ; il conviendrait alors d'élargir le spectre de gènes liés au métabolisme carboné. Compte tenu des observations faites à l'échelle du grain sur la croissance des autres variables (volume, masses d'eau du grain), il serait intéressant de regarder l'expression de gènes liés à l'état hydrique du grain (e.g. aquaporine).

Au final, HeatWheat a délivré les résultats attendus en terme de protocole de criblage du matériel vis-à-vis de la réponse au stress thermique, de caractérisation de lignées sensibles et résistantes et de connaissance sur les mécanismes physiologiques et moléculaires de réponse mis en place par la plante pour que son métabolisme ne soit pas impacté.

Références bibliographiques

- Barah P, Jayavelu ND, Mundy J, Bones AM.** Genome scale transcriptional response diversity among ten ecotypes of *Arabidopsis thaliana* during heat stress. *Front Plant Sci.* 2013 Dec 26 ; 4:532
- Bennett D, Reynolds M, Mullan D, Izanloo A, Kuchel H, Langridge P, Schnurbusch T.** Detection of two major grain yield QTL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under heat, drought and high yield potential environments. *Theor Appl Genet.* 2012 Nov;125(7):1473-85
- Bitá CE, Gerats T.** Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci.* 2013 Jul 31;4:273
- Bonneau J, Taylor J, Parent B, Bennett D, Reynolds M, Feuillet C, Langridge P, Mather D.** Multi-environment analysis and improved mapping of a yield-related QTL on chromosome 3B of wheat. *Theor Appl Genet.* 2013 Mar;126(3):747-61
- Brisson, Philippe Gate, David Gouache, Gilles Charmet, François-Xavier Oury, Frédéric Huard.** Why are wheat yields stagnating in Europe ? *Field Crops Research* 2010
- Calderini, D.F., Abeledo, L.G., Savin, R., Slafer, G.A.** Effect of temperature and carpel size during pre-anthesis on potential grain weight in wheat. *J. Agric. Sci.* 1999, 132, 453-459.
- Calderini, D.F., Abeledo, L.G., Savin, R., Slafer, G.A.** Final grain weight in wheat as affected by short periods of high temperature during pre- and post-anthesis under field conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 1999. 26, 453-458.
- Calderini, D.F., Reynolds, M.P., Slafer, G.A.** Source-sink effects on grain weight of bread wheat, durum wheat and triticale at different locations. *Aust. J. Agric. Res.* 2006. 57, 227-233.
- Chauhan H.** A Seed Preferential Heat Shock Transcription Factor from Wheat Provides Abiotic Stress Tolerance and Yield Enhancement in Transgenic *Arabidopsis* under Heat Stress Environment. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e79577
- Cossani CM, Reynolds MP.** Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 2012 Dec;160(4):1710-8
- Dhyani K.** Comparative physiological response of wheat genotypes under terminal heat stress. *Plant Signaling & Behavior* 2013 8:6, e24564
- Girousse C, Roche J, Guérin C, Le Gouis J, Balzegue S, Mouzeyar S, Bouzidi MF.** 2018. Coexpression network and phenotypic analysis identify metabolic pathways associated with the effect of warming on grain yield components in wheat. *PLoS One*. 2018 Jun 25;13(6):e0199434. doi: 10.1371/journal.pone.0199434.
- Gouache D, X Le Bris, M Bogard, O Deudon, C. Page, P. Gate.** Evaluating agronomic adaptation options to increasing heat stress under climate change during wheat grain filling in France. *Europ. J. Agronomy* 39 (2012) 62- 70
- Guérin C, Roche J, Allard V, Ravel C, Mouzeyar S, Bouzidi MF.** 2019 *PLoS One* publication acceptée, en cours de publication. Genome-wide analysis, expansion and expression of the NAC family under drought and heat stresses in bread wheat (*T. aestivum* L.).
- Liu H.** Common and Distinct Functions of *Arabidopsis* Class A1 and A2 Heat Shock Factors in Diverse Abiotic Stress Responses and Development. *Plant Physiology*, 2013, Vol. 163, pp. 276-290
- Mittler R.** How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* March 2012, Vol. 37, No. 3
- Morgan JM.** Osmotic Components and Properties Associated With Genotypic Differences in Osmoregulation in Wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* 19(1) 67 - 76
- Okazaki N, Okazaki K, Watanabe Y, Kato-Hayashi M, Yamamoto M, Okayama H,** 1998. Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol Cell Biol.* Feb; 18(2):887-95.
- Ortiz R.** Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). *Genet Resour Crop Evol.* 2008. 55: 1095-1140
- Qin D.** Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics* 2008, 9:432
- Rebetzke G.** Genomic regions for canopy temperature and their genetic association with stomatal conductance and grain yield in wheat. *Functional Plant Biology*, 2013, 40, 14-33
- Reynolds, M.P., Balota, M., Delgado, M.I.B., Amani, I., Fischer, R.A.** Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 1994. 21, 717-730.
- Reynolds MP.** Evaluating potential genetic gains in wheat associated with stress-adaptive trait expression in elite genetic resources under drought and heat stress. *Crop Sci.* 2007. 47: S-172-S-189
- Semenov MA, Shewry PR.** Modelling predicts that heat stress, not drought, will increase vulnerability of wheat in Europe. *Sci Rep.* 2011;1:66
- Stone, P.J., Nicolas, M.E.** Wheat cultivars vary widely in their responses of grain-yield and quality to short periods of postanthesis heat-stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 1994 21, 887-900.
- Suzuky Pinto.** Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. *Theor Appl Genet* (2010) 121:1001-10
- Tashiro T, Wardlaw IF** (1990) The effect of high temperature at different stages of ripening on grain set, grain weight and grain dimensions in the semi-dwarf wheat 'banks'. *Annals of Botany* 65: 51-61
- Wang X, Cai J, Liu F, Jin M, Yu H, Jiang D, Wollenweber B, Dai T, Cao W** (2012) Pre-anthesis high temperature acclimation alleviates the negative effects of post-anthesis heat stress on stem stored carbohydrates remobilization and grain starch accumulation in wheat. *Journal of Cereal Science* 55: 331-336
- Wollenweber, B., Porter, J.R., Schellberg, J.** Lack of interaction between extreme high-temperature events at vegetative and reproductive growth stages in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 2003 189, 142-150.
- Xu, Q.A., Paulsen, A.Q., Guikema, J.A., Paulsen, G.M.** Functional and ultrastructural injury to photosynthesis in wheat by high-temperature during maturation. *Environ. Exp. Bot.* 1995. 35, 43-54
- Yu E, Fan C, Yang Q, Li X, Wan B, Dong Y, Wang X, Zhou Y.** Identification of Heat Responsive Genes in *Brassica napus* Siliques at the Seed-Filling Stage through Transcriptional Profiling. *PLoS One.* 2014 Jul 11;9(7)