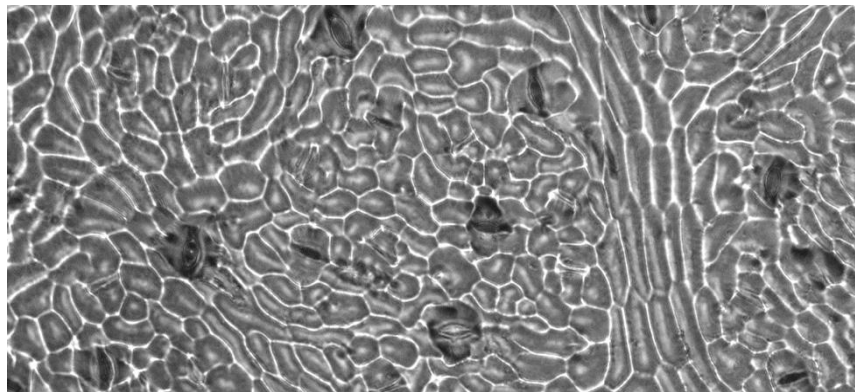


## Mémoire de fin d'études

présenté pour l'obtention du **Ingénieur agronome**

**Option : Amélioration des plantes et ingénierie méditerranéenne et  
tropicale**

**Contribution de la densité stomatique à la transpiration  
chez la vigne : approche par génétique d'association**



par **Lucille ROUX**

Année de soutenance : 2019

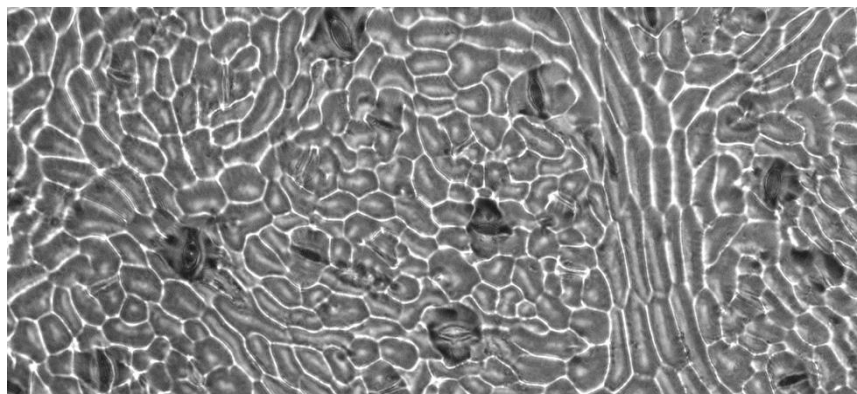
**Organisme d'accueil : Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes  
sous Stress Environnementaux**



# **Mémoire de fin d'études**

**présenté pour l'obtention du Diplôme Ingénieur agronome  
Option : Amélioration des plantes et ingénierie méditerranéenne et  
tropicale**

**Contribution de la densité stomatique à la transpiration  
chez la vigne : approche par génétique d'association**



**par Lucille ROUX**

**Année de soutenance : 2019**

**Mémoire préparé sous la direction  
de : Anna Medici**

**Présenté le : 19/09/2019**

**devant le jury :**

**Jacques DAVID**

**Pierre BERTHOMIEU**

**Cécile GRENIER**

**Organisme d'accueil : Laboratoire  
d'Ecophysologie des Plantes sous  
Stress Environnementaux**

**Maître de stage : Florent PANTIN**

**Encadrants supplémentaires :**

**Adrianus Westgeest**

**Thierry Simonneau**

**Jean-Luc Verdeil**



## Résumé

La viticulture est fortement affectée par le changement climatique, notamment par des épisodes de sécheresse plus fréquents et extrêmes. Une stratégie d'adaptation est la sélection de variétés avec une meilleure efficacité d'utilisation d'eau (WUE). Récemment il a été montré que la WUE est améliorée en diminuant les pertes en eau pendant la nuit (transpiration nocturne) et qu'il existe de la variation génétique pour ce caractère chez la vigne. Les stomates contrôlent la transpiration par leur niveau de fermeture et par leur nombre, mais la contribution de chacun de ces caractères à la transpiration nocturne est inconnue. L'objectif de cette étude, réalisée grâce au soutien financier du GIS Fruits, est de caractériser la contribution des caractéristiques anatomiques foliaires, comme la densité stomatique (nombre de stomate par unité de surface foliaire) et la taille des stomates par exemple, sur la transpiration diurne et nocturne, et de rechercher les déterminismes génétiques de ces caractères anatomiques. Pour cette étude, une méthode d'analyse d'image a été développée pour mesurer treize variables anatomiques foliaires dans un panel d'association de 279 cépages. De manière surprenante, une faible corrélation positive a été trouvée entre la densité stomatique et la transpiration diurne mais pas pour la transpiration nocturne. De plus, nous n'avons pas retrouvé la corrélation négative attendue entre la densité stomatique et la taille des stomates. Sur cinq des variables anatomiques foliaires, aucune association significative n'a été trouvée exceptée pour une variable caractérisant l'aspect allongé des cellules épidermiques. Cependant, l'effet de l'opérateur d'analyse d'images était une source de variation significative causant du bruit dans les analyses génétiques, laissant entrevoir la possibilité de découvrir des associations à l'aide d'une exploration plus approfondie. Un regard critique est proposé sur les résultats et les méthodes, et des améliorations sont suggérées.

### Mots clés

[Vigne, densité stomatique, anatomie des stomates, transpiration, génétique d'association]

Pour citer ce document : [Roux, Lucille, 2019. Contribution de la densité stomatique à la transpiration chez la vigne : approche par génétique d'association. Mémoire d'Ingénieur Agronome, option Amélioration des plantes et ingénierie méditerranéenne et tropicale, Montpellier SupAgro. 100 pages.]





## **Abstract**

### **Title: Contribution of stomatal density to transpiration in grapevine, a genome wide association study**

Climate change affects viticulture through an increase in the frequency and intensity of drought episodes. A strategy to adapt grapevine may be to improve its water-use efficiency (WUE). Recently, reducing nocturnal transpiration has been shown to increase WUE in grapevine. Moreover, genetic variability was found in grapevine for nocturnal transpiration indicating a potential breeding target. Nocturnal transpiration is mainly caused by the residual aperture and number of stomata, but their contributions to nocturnal transpiration are unknown. The goal of this study, which would have not taken place without the GIS Fruits' funding, is investigate the contribution of anatomical characteristics, like stomatal density (number of stomata per unit leaf area) or stomata size, to daytime and nocturnal transpiration, and to investigate their genetic determinisms. An image analysis pipeline was developed to measure 13 leaf anatomical traits including stomatal density and stomata size in an association panel consisting out of 279 grapevine cultivars. Surprisingly, stomatal density correlated only slightly with daytime transpiration but not with nocturnal transpiration. Contrary to our expectation, no negative correlation was found between stomatal density and stomata size. We performed a genome-wide association analysis on five anatomical variables among the 13 that we had measured, notably on the density and size of stomata. We did not detect any significant association except one for one variable describing the shape of pavement cells that was not among the main variables of interest. The reason for the low number of genetic associations found may be caused by a strong experimenter effect during image analysis. The results and the possible method improvements are discussed.

### **Key words**

[Grapevine, stomatal density, stomatal anatomy, transpiration, GWAS]





## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier particulièrement mes encadrants, à savoir Florent Pantin, Adriaan Westgeest, Thierry Simonneau et Jean-Luc Verdeil, ainsi que ma tutrice Anna Medici, pour leurs conseils et leur supervision tout au long du stage. Aude Coupel-Ledru a participé à toute la deuxième moitié de mon stage. Son aide a été précieuse sur les aspects génétiques ainsi que pour le phénotypage et je l'en remercie grandement. J'ai beaucoup apprécié cette collaboration très riche d'enseignements. Je tiens à souligner l'aide apportée par Agnès Doligez et Thimotée Flutre de l'équipe DAAV (UMR AGAP) pour l'analyse de génétique d'association que j'ai dû mener. Je remercie vivement pour leur patience infinie les personnes ayant participé aux travaux d'imagerie, en particulier Gaëlle Rolland et Aurélien Ausset. Marc Lartaud, Christelle Baptiste et Carine Alcon méritent également de grands remerciements pour le temps passé à travailler avec moi sur le protocole d'empreinte, d'acquisition et de traitement des images. Je remercie également l'ensemble du personnel du LEPSE qui m'a accueillie avec bienveillance. Je remercie le GIS Fruits dont le financement a permis la tenue de mon stage. Pour finir, je souhaite remercier mes collègues et amis d'APIMET pour les heures passées à échanger idées, conseils et astuces tout au long du stage.



## Table des matières

Résumé.....	3
Abstract .....	6
Remerciements .....	8
Table des matières .....	10
Table des figures et tableaux .....	14
Glossaire.....	18
Sigles et acronymes .....	20
Introduction .....	22
1 Etat de l'art.....	24
1.1 Viticulture et changement climatique : améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau.....	24
1.2 Transpiration diurne et nocturne, facteurs de (dé)couplage.....	26
1.3 Effet des caractéristiques anatomiques des stomates sur la conductance stomatique et l'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée.....	28
1.4 Mécanismes biologiques du développement et du fonctionnement des stomates .....	36
2 Question de recherche et objectif du stage.....	40
3 Matériels et méthodes .....	42
3.1 Matériel végétal et culture des plantes.....	42
3.2 Prélèvement des feuilles et mesure de transpiration .....	42
Empreintes épidermiques.....	44
3.3.....	44
Analyse d'images.....	44
3.4.....	44
3.5 Filtrage des données.....	49
3.6 GWAS.....	49
4 Résultats.....	53
4.1 Résultats sur 5 variables anatomiques et 3 variables de transpiration .....	53
4.1.1 Visualisation des données.....	53
4.1.2 Héritabilité des caractères.....	55
4.1.3 Résultats de la GWAS .....	55
4.2 Questionnement sur la gestion des données : exemple de la densité stomatique aréolaire et de l'effet opérateur .....	65
4.2.1 Première approche : garder tous les opérateurs pour maximiser le nombre d'observations .....	65



4.2.2	Deuxième approche : ne considérer que le sous-échantillon réalisé par les deux opérateurs principaux pour mieux distinguer l'effet opérateur de l'effet génotype.....	69
4.2.3	Troisième approche : changement de population .....	73
5	Discussion.....	77
5.1	Confrontation des résultats avec les corrélations observées dans la littérature .....	77
5.2	Difficultés liées à l'acquisition des données anatomiques à haut débit .....	79
5.3	Une sous-exploitation des valeurs de transpiration .....	83
5.4	Des facteurs environnementaux et développementaux parfois mal contrôlés .....	83
5.5	Une analyse génétique à perfectionner .....	85
	Conclusion.....	87
	Références bibliographiques .....	89
	Annexes.....	99
	Travail réalisé au cours du stage .....	103



## Table des figures et tableaux

Figure 1 – Corrélation entre les valeurs génotypiques des transpiration diurne et nocturne sous condition de bonne irrigation (Coupel-Ledru et al., 2016) .....	27
Figure 2 - Localisation des QTLs détectés pour la transpiration nocturne (En), diurne (Ed), l'efficacité de transpiration (TE), le potentiel hydrique à l'aube ( $\Psi_{pd}$ ), la croissance ( $\Delta$ biomass) et la surface foliaire (LA) (Coupel-Ledru et al., 2016).....	27
Figure 3 - Schéma des relations entre les variables stomatiques et l'efficacité d'utilisation de l'eau .....	35
Figure 4 - Processus d'ouverture (à gauche) et de fermeture (à droite) des stomates (Jezek and Blatt, 2017) .....	37
Figure 5 - Stomatal development in Arabidopsis : Cell transitions and key regulatory pathways within the stomatal lineage. (Han and Torii, 2016).....	37
Figure 6 - Zones de prélèvement des empreintes épidermiques (ellipses rouges) .....	43
Figure 7 - Principe de fonctionnement de la macro d'analyse d'images.....	43
Figure 8 - Matrice de corrélation (SI_areole=Indice stomatique aréolaire, mean_area_stomata=Surface des stomates, mean_major_stomata=Longueur des stomates, mean_minor_stomata=Largeur des stomates, mean_area_epid=Surface des cellules épidermiques, median_AR_epid=Ratio d'aspect des cellules épidermiques, median_round_epid=Rondeur des cellules épidermiques, median_circ_epid=Circularité des cellules épidermiques, median_solidity_epid=Solidité des cellules épidermiques) .....	52
Figure 9 - Manhattan plot pour la densité stomatique aréolaire (seuil de Bonferroni en rouge).....	56
Figure 10 - Manhattan plot pour la surface des stomates (seuil de Bonferroni en rouge).....	56
Figure 11 - Manhattan plot pour la longueur des stomates (seuil de Bonferroni en rouge) .....	58
Figure 12 - Manhattan plot pour la largeur des stomates (seuil de Bonferroni en rouge).....	58
Figure 13 - Manhattan plot pour le ratio d'aspect des cellules épidermiques (seuil de Bonferroni en rouge) .....	60
Figure 14 - Manhattan plot pour la transpiration diurne (seuil de Bonferroni en rouge) .....	60
Figure 15 - Manhattan plot pour la transpiration nocturne (seuil de Bonferroni en rouge) .....	62
Figure 16 - Manhattan plot pour la transpiration sur 24 heures (seuil de Bonferroni en rouge).....	62
Figure 17 - Distribution de la densité stomatique aréolaire dans le premier cas de gestion des données.....	64
Figure 18 - Boxplots de la densité stomatique aréolaire selon l'opérateur en imagerie .....	64
Figure 19 - Distribution des BLUPs de densité stomatique aréolaire .....	66



---

Figure 20 - Manhattan plot des associations pour la densité stomatique aréolaire dans le premier cas de gestion des données, identique à la Figure 10, pour le confort du lecteur.....	66
Figure 21 - Boxplot de la densité stomatique dans le deuxième cas de gestion des données .....	68
Figure 22 - Boxplots de la densité stoamtique selon l'opérateur en imagerie dans le deuxième cas de gestion des données.....	68
Figure 23 - Distribution des BLUPs du modèle 2 dans le deuxième cas (a), BLUPs utilisés pour le second cas en fonction des BLUPs utilisé pour le premier (b).....	70
Figure 24 – Comparaison entre le Manhattan plot du premier cas identique à la Figure 10 (a) et du second (b) pour la densité stomatique aréolaire (seuil de Bonferroni en rouge).....	70
Figure 25 - Boxplot de la densité stomatique aréolaire dans le troisième cas de gestion de données .....	72
Figure 26 - Comparaison des valeurs de densité stomatique aréolaire selon l'opérateur .....	72
Figure 27 - Comparaison des Manhattan plots dans les 3 cas de gestion de données : a) cas 1 identique à la Figure 24 haut, b) cas 2 identique à la Figure 24 bas, c) cas 3. ....	74
Tableau 1 - Caractéristiques mesurées à partir des empreintes épidermiques .....	43
Tableau 2 - Modèles mixtes testés pour chaque variable .....	48
Tableau 3 - Intervalles de valeurs des caractères d'intérêt.....	52
Tableau 4 - Héritabilité individuelle et du dispositif des caractères étudiés .....	54
Tableau 5 - Comparaison des modèles mixtes testés .....	64
Tableau 6 - Classement des modèles mixtes testés dans la deuxième approche de gestion des données.....	68
Tableau 7 - Classement et description des modèles testés .....	72



## Glossaire

AR (Aspect Ratio) : ratio d'aspect, soit ratio entre l'axe long et l'axe court d'une ellipse, dans cette étude caractérise l'aspect allongé des cellules épidermiques

Aréole : sur la feuille, maille épidermique délimitée par le réseau de nervures

BLUPs (Best Linear Unbiased Predictors) : dans cette étude prédictors des valeurs génotypiques pour un caractère donné

Conductance stomatique : inverse de la résistance des stomates à la diffusion des gaz, autrement dit, aptitude des stomates à faciliter les échanges gazeux entre la feuille et l'atmosphère

Densité stomatique : nombre de stomates par unité de surface foliaire

Densité stomatique aréolaire : nombre de stomates par unité de surface au sein d'une aréole

WUE (Water Use Efficiency) : efficacité d'utilisation de l'eau, soit la quantité de biomasse produite par rapport à la quantité d'eau évapotranspirée

WUE<sub>i</sub> : efficacité d'utilisation de l'eau instantanée soit le rapport entre la photosynthèse et la transpiration



## **Sigles et acronymes**

AR : Aspect Ratio (ratio d'aspect)

BIC : Bayesian Information Criterion (critère d'information bayésien)

BLUP : Best Linear Unbiased Predictor (meilleure prédiction linéaire non biaisée)

GWAS : Genome Wide Association Study (étude de génétique d'association)

WUE : Water Use Efficiency (efficience d'utilisation de l'eau)



# Introduction

Avec le changement climatique, les épisodes de sécheresse se font de plus en plus fréquents et intenses (IPCC, 2015). Le rendement et la qualité des productions agricoles sont ainsi menacés par le stress hydrique. Certaines cultures, situées dans des régions déjà touchées par des épisodes de sécheresse, sont très concernées. C'est le cas de la vigne, en particulier sur le pourtour du bassin méditerranéen (Moriondo et al., 2013; Fraga et al., 2016). L'irrigation des vignobles n'est pas toujours possible soit pour des questions de gestion de la ressource en eau d'un point de vue durable soit parce que le cahier des charges auquel adhèrent les producteurs l'interdit. Ainsi, mieux maîtriser les pertes en eau semble indispensable pour adapter les vignobles aux contraintes climatiques futures. Des éléments de réponses agronomiques, dont génétiques, existent pour répondre à cette problématique en réduisant l'utilisation de l'eau ou en améliorant son efficacité d'utilisation (Simonneau et al., 2014).

La transpiration des plantes s'effectue au niveau de structures cellulaires, les stomates, formant des pores à la surface des feuilles. La transpiration stomatique est couplée à l'absorption du CO<sub>2</sub> au cours de la journée. La capacité d'échange gazeux des stomates, caractérisée par la conductance stomatique, est facilitée à la fois par l'ouverture des stomates et par leur nombre. Ainsi, la densité stomatique, ou le nombre de stomates par unité de surface foliaire, participe à la détermination du niveau de transpiration diurne et de photosynthèse. De plus, les feuilles de vignes transpirent également la nuit en raison d'une fermeture incomplète des stomates (Coupel-Ledru et al., 2016). La densité stomatique détermine donc également le niveau de transpiration nocturne. La réduction de la transpiration nocturne est une cible de sélection intéressante pour améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau (la quantité de biomasse produite par unité d'eau transpirée) chez la vigne (Coupel-Ledru et al., 2016). Donc, comprendre le déterminisme génétique de la densité stomatique, des caractères anatomiques associés, et leur contribution à la transpiration nocturne, pourrait participer à améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau. Dans ce contexte, une approche par génétique d'association sur un panel de 279 accessions a été réalisée, avec des mesures de transpiration sur feuilles détachées et de caractéristiques anatomiques sur empreintes épidermiques des mêmes feuilles. L'étude, réalisée grâce au soutien financier du GIS Fruits, présente les concepts importants liés à l'efficacité d'utilisation de l'eau chez la vigne, puis la méthode que nous avons utilisée pour réaliser les mesures et les analyses. Puis, nous exposons les résultats principalement sur quatre caractères anatomiques des stomates (densité, taille, longueur et largeur), un paramètre de forme des cellules épidermiques, et la transpiration diurne et nocturne. Une évaluation critique de l'acquisition et de la gestion du jeu de données est formulée en discussion.





# 1 Etat de l'art

## 1.1 Viticulture et changement climatique : améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) représente la quantité de biomasse produite par rapport à la quantité d'eau utilisée (Bacon, 2004). Du point de vue viticole, cette efficacité correspond au rapport entre le poids de vendange et la quantité d'eau évapotranspirée pendant la durée du cycle. Pour mieux comprendre comment cette efficacité s'élabore, on peut la décomposer en plusieurs termes qui reflètent les différents processus qui la régissent. Parmi ces composantes, l'efficacité de la transpiration (TE) s'est révélée une cible de choix pour l'amélioration génétique, notamment chez le blé où certains programmes de sélection basés sur ce caractère ont été jusqu'à l'inscription de nouvelles variétés (Rebetzke et al., 2002; Condon et al., 2004). La diversité génétique de la vigne pour ce caractère suggère que l'amélioration variétale pour la tolérance à la sécheresse est également possible chez cette espèce (Wolkovich et al., 2018).

L'efficacité de la transpiration se rapporte au couplage étroit entre transpiration et photosynthèse que le fonctionnement des stomates implique. Les stomates sont des complexes cellulaires qui forment de minuscules pores à la surface des feuilles. En s'ouvrant pour faciliter la diffusion du CO<sub>2</sub> atmosphérique jusqu'aux chloroplastes et ainsi accélérer la photosynthèse, les stomates laissent la vapeur d'eau contenue dans la feuille s'échapper vers l'atmosphère (Hetherington and Woodward, 2003). Ainsi, les stomates favorisent les échanges gazeux dans les deux directions : en s'ouvrant, ils accélèrent non seulement la photosynthèse (gain de carbone), mais aussi la transpiration (perte en eau).

La recherche de cépages capables d'assurer une photosynthèse élevée en même temps qu'une transpiration modérée constitue donc une voie privilégiée d'amélioration variétale. Le rapport entre photosynthèse et transpiration est qualifié d'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée (iWUE). Mesuré à l'échelle de la feuille à l'aide d'appareils d'échanges gazeux, ce caractère montre une large variabilité génétique chez la vigne (Tomás et al., 2012; Tomás et al., 2014). Alternativement, le dosage de l'enrichissement en <sup>13</sup>C dans les feuilles ( $\delta^{13}\text{C}$ ), technique basée sur la discrimination isotopique du carbone qui a lieu durant la photosynthèse (Farquhar et al., 1982), est moins fastidieuse et plus intégrée. Cette méthode donne une indication de l'efficacité de transpiration moyennée sur la durée de vie de la feuille, et montre de la variabilité parmi les cépages (Gibberd et al., 2001; Chaves et al., 2007; Tomás et al., 2012).



Si la décomposition de la WUE en caractères élémentaires tels que la *iWUE* donne accès à des caractères héréditaires – et donc intéressants dans une perspective d'amélioration variétale, notons toutefois que les indicateurs foliaires qui ne se basent que sur les échanges gazeux restent peu ou pas corrélés avec l'efficacité d'utilisation de l'eau à l'échelle de la plante entière chez la vigne (Tomás et al., 2012; Tomás et al., 2014). En effet, les phénomènes de croissance et d'allocation entre les différents organes ne sont pas pris en compte par ces indicateurs, qui ne s'intéressent qu'à la composante photosynthétique du carbone dans la plante (Flexas et al., 2010; Medrano et al., 2015; Douthe et al., 2018). Par ailleurs, ces indicateurs ne considèrent par nature que la composante diurne des échanges gazeux, et négligent une composante importante du bilan hydrique : la transpiration nocturne.

## **1.2 Transpiration diurne et nocturne, facteurs de (dé)couplage**

Mon équipe d'accueil (ETAP, UMR LEPSE) a récemment exploré la possibilité de réduire la transpiration nocturne chez la vigne pour améliorer son efficacité de l'utilisation de l'eau. Chez la majorité des plantes, dont la vigne, les stomates se ferment lorsque le rayonnement lumineux diminue. Cependant, la fermeture stomatique reste incomplète pendant la nuit, où la transpiration peut atteindre jusqu'à 30% des valeurs relevées en période diurne chez certaines espèces (Caird et al., 2007). En première approche, la transpiration nocturne représente une perte en eau non productive : pendant la nuit, la photosynthèse ne peut s'effectuer faute de rayonnement, et l'ouverture des stomates pour faciliter l'entrée du CO<sub>2</sub> apparaît alors inutile. Cette perte nocturne représente donc une potentielle marge de manœuvre pour réduire la consommation d'eau sans pénaliser la photosynthèse.

L'équipe a ainsi montré qu'on pouvait sélectionner certains génotypes de vigne pour réduire la transpiration nocturne sans affecter l'assimilation du carbone et la croissance de la plante (Coupel-Ledru et al., 2016). Ce résultat a été obtenu en comparant 186 descendants issus d'un croisement entre deux cépages emblématiques du Sud de la France, l'un réputé consommateur d'eau (Syrah, anisohydrique) et l'autre plus économe (Grenache, isohydrique) (Schultz, 2003).

Les pertes d'eau nocturnes sont majoritairement d'origine stomatique (i.e. non cuticulaire), à savoir que les génotypes qui ont la transpiration nocturne la plus forte sont ceux dont les stomates montrent une fermeture incomplète et/ou une densité élevée (Coupel-Ledru et al., 2016). Le niveau résiduel d'ouverture stomatique dépend de nombreux processus physiologiques, spécifiques à la nuit ou non (Costa et al., 2015; voir I.4). Aussi, il n'y a pas de lien systématique entre l'ouverture résiduelle nocturne et l'ouverture diurne. La densité stomatique (nombre de stomates par unité de

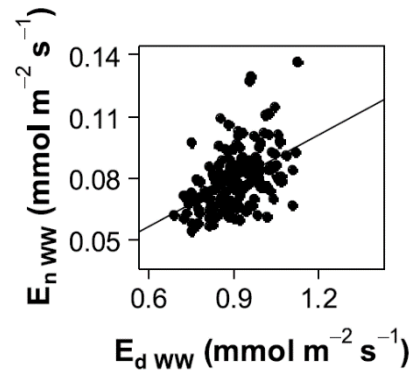


Figure 1 – Corrélation entre les valeurs génotypiques des transpiration diurne et nocturne sous condition de bonne irrigation (Coupel-Ledru et al., 2016)

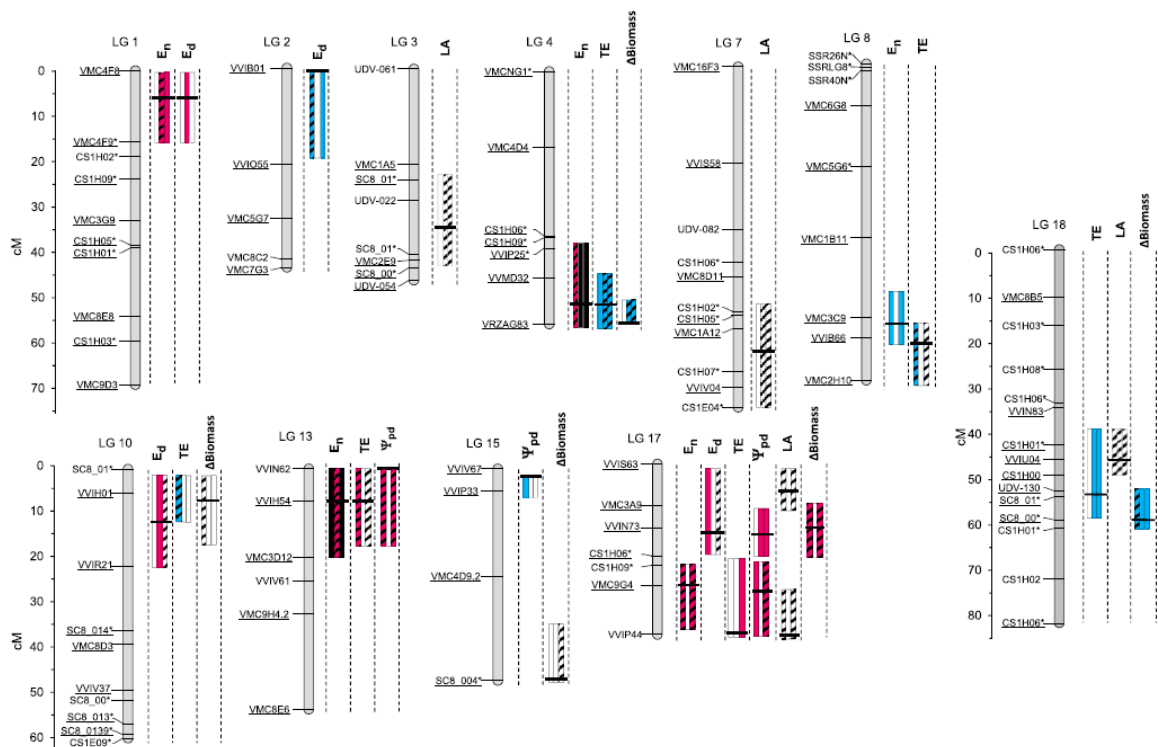


Figure 2 - Localisation des QTLs détectés pour la transpiration nocturne ( $E_n$ ), diurne ( $E_d$ ), l'efficacité de transpiration ( $TE$ ), le potentiel hydrique à l'aube ( $\Psi_{pd}$ ), la croissance ( $\Delta biomass$ ) et la surface foliaire ( $LA$ ) (Coupel-Ledru et al., 2016)

surface foliaire), quant à elle, résulte de mécanismes développementaux qui contrôlent l'espacement régulier des stomates sur l'épiderme (Pillitteri and Torii, 2012; voir I.4). La densité détermine aussi bien le niveau de transpiration diurne que nocturne, puisque la conductance stomatique est directement proportionnelle à cette densité (Dow et al., 2014). Au bilan, chez la vigne, la variabilité génétique des différents processus en jeu résulte en une corrélation significative mais très dispersée entre transpiration diurne et nocturne (figure 1).

Réduire la transpiration nocturne peut améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau, mais pas de manière univoque. D'un côté, la fermeture stomatique nocturne augmente l'efficacité d'utilisation de l'eau non seulement en réduisant les pertes en eau pendant la nuit, mais aussi en augmentant la croissance via une meilleure récupération de l'état hydrique des feuilles, favorisant l'expansion cellulaire avant l'augmentation de la transpiration au lever du jour. Mais d'un autre côté, une faible transpiration nocturne peut également être associée à des stomates nativement moins « permissifs » (densité peu élevée, capacité et vitesse d'ouverture faibles), ce qui pénalise la photosynthèse en phase diurne, et potentiellement la croissance. De manière cohérente avec cette complexité, l'équipe a détecté plusieurs loci de caractères quantitatifs (QTLs) pour la transpiration nocturne, montrant des co-localisations partielles avec des QTLs de transpiration diurne et d'efficacité d'utilisation de l'eau (figure 2). Cependant, dans cette étude, la densité stomatique n'a pas été analysée de manière systématique sur toute la population. Par ailleurs, le nombre excessif de gènes sous-jacents à ces QTLs ne permet pas de dégager des candidats. La possibilité de passer d'une population biparentale à un panel de génétique d'association (Nicolas et al., 2016) permet d'espérer lever cette difficulté.

Il est donc nécessaire de clarifier les relations génétiques entre transpiration nocturne, transpiration diurne, ouverture stomatique et densité stomatique, en vue de raisonner l'utilisation de ces caractères pour améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau.

### ***1.3 Effet des caractéristiques anatomiques des stomates sur la conductance stomatique et l'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée***

L'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée, ou  $iWUE$ , est le rapport entre la photosynthèse et la transpiration. Les stomates offrent une résistance diffusive à ces échanges gazeux, et la conductance stomatique ( $g_s$ ) est l'inverse de cette résistance. Toutes choses égales par ailleurs, une augmentation de  $g_s$  augmente la transpiration plus fortement que la photosynthèse, cette dernière



étant également soumise à des limitations biochimiques ; ainsi, une augmentation de  $g_s$ , même au bénéfice de la photosynthèse, se traduit généralement par une diminution de la  $iWUE$  (Condon et al., 2004). Néanmoins, les amplitudes respectives de ces variations sont très dépendantes des conditions microclimatiques, en particulier le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) et la concentration en  $CO_2$  atmosphérique qui limitent la photosynthèse au même titre que  $g_s$  et de manière non-linéaire (Lawson and Blatt, 2014). La valeur optimale de  $g_s$  en fonction des conditions environnementales est donc associée à un compromis entre la nécessité d'une photosynthèse élevée pour la production de biomasse, et la recherche d'une  $iWUE$  importante notamment lorsque l'eau est une ressource limitante. La régulation de  $g_s$  dépend des propriétés anatomiques et des physiologiques des stomates (Lawson and Blatt, 2014; Faralli et al., 2019). Dans cette partie, nous nous intéresserons essentiellement aux caractéristiques anatomiques, mais nous verrons aussi que le fonctionnement stomatique  $y$  est intimement connecté. Nous présentons les liens entre caractéristiques anatomiques des stomates,  $g_s$  et  $iWUE$ , d'abord en conditions stationnaires (conductance maximale) puis en réponse à des variations environnementales (vitesse de réponse). En mesurant la taille et la densité des stomates, on peut estimer une  $g_s$  maximale théorique qui reflète la capacité d'une feuille pour les échanges gazeux (Franks and Beerling, 2009a). Plus la fraction de pore sur l'épiderme est importante, plus la  $g_s$  maximale est importante. La valeur « opérationnelle » de  $g_s$  (celle que la feuille atteint réellement en conditions physiologiques) représente typiquement 20-25% de cette  $g_s$  maximale (McElwain et al., 2016), car c'est dans cette gamme que les variations de turgescence des cellules de garde ont le plus d'impact sur  $g_s$  (Franks et al., 2012). Au-delà des régulations de court terme, les plantes s'acclimatent et s'adaptent aux facteurs de l'environnement comme le  $CO_2$  atmosphérique, le PAR ou l'état hydrique du sol en modifiant la taille et la densité de leurs stomates, ce qui permet un contrôle stomatique des échanges gazeux plus efficace dans les conditions environnementales prédominantes (Doheny-Adams et al., 2012; de Boer et al., 2016).

La densité stomatique est depuis longtemps citée comme une cible de sélection pour la tolérance des plantes à la sécheresse (Jones, 1998). Globalement, lorsqu'on augmente (resp. réduit) la densité stomatique et en conséquence  $g_s$ , on réduit (resp. augmente) la  $iWUE$ . C'est notamment le cas lorsque l'on manipule génétiquement la voie du développement stomatique, que ce soit chez *Arabidopsis* (Yoo et al., 2010; Tanaka et al., 2013; Franks et al., 2015; Hepworth et al., 2015), l'orge (Hughes et al., 2017), le riz (Caine et al., 2019) ou le blé (Dunn et al., 2019), avec des amplitudes d'effet qui dépendent des conditions de culture (déficit hydrique du sol) et de mesure (PAR,  $CO_2$ ). Mais les variations de densité stomatique peuvent être contrebalancées par des variations d'ouverture dans le sens opposé. A l'échelle interspécifique, il existe une corrélation fortement négative entre densité stomatique et taille du pore (Hetherington and Woodward, 2003;





Franks and Beerling, 2009b). Chez *Arabidopsis*, la réduction de 40 % ou l'augmentation de 300 % de la densité stomatique par des manipulations du gène *SDD1* (*STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1*, un régulateur négatif de la production de stomates) est totalement compensée par une augmentation ou une réduction de l'ouverture stomatique, respectivement ; ainsi, la manipulation de *SDD1* n'a pas permis de faire varier  $g_s$  significativement dans les conditions de culture (Büßis et al., 2006). Notons cependant que la présence ou l'absence d'effet de la densité stomatique sur  $g_s$  dépend fortement des conditions environnementales : si l'intensité du rayonnement augmente on retrouve l'effet positif de la densité stomatique sur  $g_s$  (Büßis et al., 2006).

Le compromis entre densité et taille stomatique traduit l'existence d'un optimum physiologique pour la fraction de l'épiderme qui est alloué aux stomates (de Boer et al., 2016, figure 3). Globalement, les échanges gazeux augmentent quand cette fraction augmente.

Cependant, et au-delà de l'effet négatif sur la *iWUE* susmentionné, plusieurs difficultés apparaissent lorsque cette fraction devient trop importante. Premièrement, les stomates sont des systèmes électrophysiologiques dont le fonctionnement et la maintenance sont coûteux en énergie (Jezek and Blatt, 2017). Deuxièmement, la rapidité d'ouverture ou de fermeture stomatique peut être affectée lorsque des stomates sont trop proches, à cause des relations hydromécaniques entre cellules de garde et cellules épidermiques adjacentes qui contrôlent les mouvements des stomates (Franks and Farquhar, 2007). Troisièmement, au-delà d'une certaine fraction allouée aux stomates, la promiscuité des ostioles génère des interférences dans le processus de diffusion : la vapeur d'eau sortant d'un stomate est « gênée » par celle de ses voisins qui « saturent » la surface évaporante, ce qui ralentit le flux (Parlange and Waggoner, 1970; Lehmann and Or, 2015). Ainsi, le fonctionnement stomatique devient moins efficace lorsque la fraction de l'épiderme allouée aux stomates augmente trop, que ce soit à cause de stomates trop grands ou de densités trop élevées.

Sans doute pour cette raison, le programme développemental de la production stomatique chez la majorité des plantes est tel que deux stomates sont toujours séparés par au moins une cellule épidermique (voir I.4). Lorsque cette règle d'espacement minimal est outrepassée par des modifications génétiques conduisant à la présence de plusieurs stomates adjacents (*clustering*), le comportement stomatique est particulièrement affecté, comme illustré chez *Arabidopsis* : réduction de la  $g_s$  maximale due à un défaut de la capacité d'ouverture, moindre réponse aux stimuli externes (Dow et al., 2014). L'opposition des pressions de turgescence de stomates adjacents et/ou des réarrangements dans les propriétés du cytosquelette ou de la paroi des cellules de garde créeraient les conditions hydromécaniques à l'origine d'une ouverture stomatique réduite. Une autre



possibilité est que la capacité d'acheminement de l'eau dans une feuille n'est pas assez importante pour approvisionner des stomates extrêmement rapprochés (Brodribb et al., 2007), générant une limitation hydraulique à l'origine du bridage de la capacité d'ouverture des stomates en cluster. En revanche, l'hypothèse d'une compétition pour le  $K^+$  (principal osmolyte associé à l'ouverture) chez les stomates en cluster, en l'absence de cellules épidermiques adjacentes qui pourraient jouer un rôle de réservoir, n'est pas étayée par les résultats d'une autre étude (Papanatsiou et al., 2016). Enfin, le phénomène d'interférence de diffusion décrit plus haut contribue probablement à limiter la conductance des stomates en cluster (Franks and Casson, 2014). Ce mode extrême de développement stomatique représente sans doute l'unique configuration permettant de révéler un effet significatif de l'interférence de diffusion sur les échanges gazeux.

Au-delà de ces phénotypes extrêmes de mutants avec stomates adjacents, il existe une variabilité génétique naturelle entre des stomates uniformément distribués sur la surface de l'épiderme et des stomates préférentiellement regroupés en cluster (Faralli et al., 2019). Pour une même densité, les stomates en cluster seraient à l'origine d'une moindre *iWUE* à cause des effets cités ci-dessus, et également à cause de la moindre diffusion interne du  $CO_2$  lorsque les cavités sous-stomatiques ne sont pas uniformément distribuées parmi les cellules des parenchymes mésophylliens (Büßis et al., 2006).

Il existe également des particularités anatomiques propres à certaines espèces. Chez *Populus trichocarpa*, la plupart des génotypes ne portent des stomates que sur la face abaxiale, mais certains génotypes en portent également sur la face adaxiale, dont quelques-uns organisés en cluster autour des nervures (McKown et al., 2014). La signification fonctionnelle de cette observation reste à découvrir. Chez *Begonia plebeja*, une espèce adaptée aux climats secs qui forme naturellement des clusters de deux stomates surplombant la même cavité sous-stomatique et séparés par une petite cellule spécialisée,  $g_s$  et sa dynamique de réponse à la lumière et à l'obscurité sont similaires à ceux d'une autre espèce de *Begonia* formant des stomates uniques et plus gros, tandis que sa *iWUE* est légèrement augmentée (Papanatsiou et al., 2017).

Les caractéristiques anatomiques des stomates jouent également sur leur dynamique en réponse à des perturbations environnementales, et donc sur la *iWUE* (Lawson and Blatt, 2014). C'est notamment le cas lorsque la lumière fluctue comme en conditions naturelles. En effet, les stomates s'ouvrent (resp. se ferment) lorsque le PAR augmente (resp. diminue), mais avec un rythme d'un ordre de grandeur plus lent que celui des processus photochimiques, créant un décalage temporel entre demande mésophyllienne et offre stomatique en  $CO_2$ . Accélérer les dynamiques d'ouverture et de fermeture stomatique pourraient conduire à des gains de 20 à 30 % sur la *iWUE* (Lawson and Blatt, 2014). Globalement, les stomates de petite taille sont plus rapides que ceux de grande taille (Drake et al., 2013). Deux explications peuvent être avancées. D'une part, la membrane plasmique

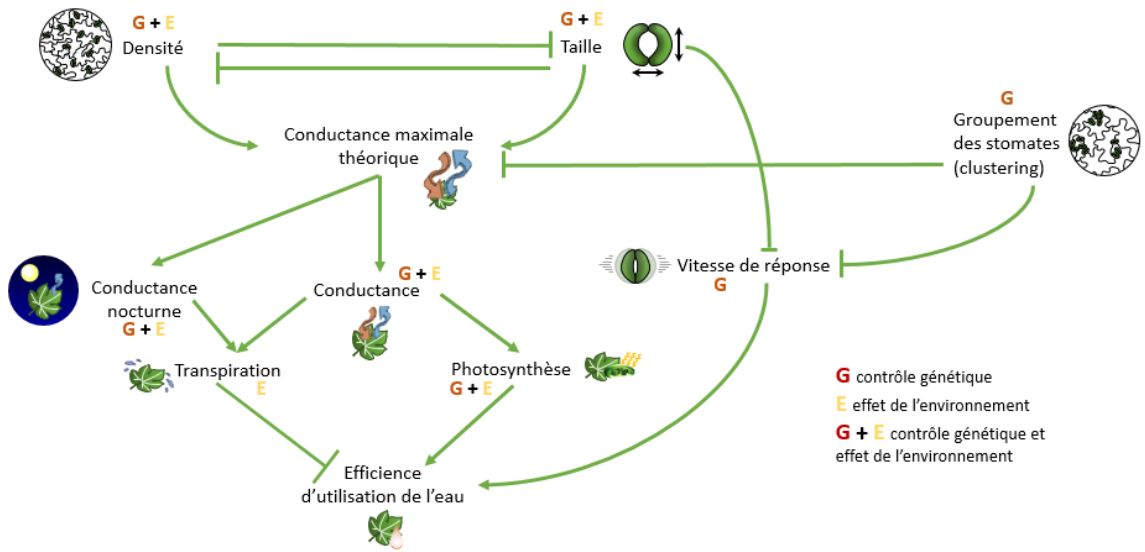


Figure 3 - Schéma des relations entre les variables stomatiques et l'efficacité d'utilisation de l'eau

des cellules de garde ne serait pas suffisamment élastique pour supporter l'ouverture stomatique sans apport de nouvelle surface membranaire, ou la fermeture stomatique sans internalisation (Shope et al., 2003). Ainsi, les petits stomates auraient moins de flux de surface membranaire à traiter pour maintenir leur intégrité cellulaire pendant les mouvements. D'autre part, le ratio surface de membrane sur volume de cellule est plus élevé chez les petits stomates, et donc plus favorable aux échanges d'ions (Hetherington and Woodward, 2003). En effet, les dynamiques stomatiques sont essentiellement contrôlées par l'activité des transporteurs membranaires responsables des flux d'osmotocums entrant et sortant des cellules de garde. Ainsi, le ratio surface/volume plus important chez les petits stomates permettrait un gain d'efficacité pour une population de transporteur donnée. Cela pourrait également accélérer la régulation de ces transporteurs, que ce soit en terme de conformation moléculaire ou de localisation subcellulaire (Homann and Thiel, 2002; Eisenach et al., 2012). Notons toutefois que l'effet du ratio surface/volume est de second ordre comparé à la manipulation directe de l'activité des transporteurs membranaires (Lawson and Blatt, 2014). Par exemple, l'introduction chez Arabidopsis d'un canal potassique activé par la lumière bleue et exprimé spécifiquement dans les cellules de garde permet de diminuer les temps d'ouverture et de fermeture d'environ 40 % (Papanatsiou et al., 2019).

Au final, les relations entre les caractéristiques anatomiques stomatiques (densité, taille, clustering), leur dynamique de fonctionnement stomatique et l'efficacité d'utilisation de l'eau se place dans un cadre physio-développemental complexe. Le schéma présenté en figure 3 résume une partie de de ces relations, montrant que l'efficacité d'utilisation de l'eau est en partie conditionnée par les caractéristiques anatomiques stomatiques via l'influence qu'elles ont sur la conductance stomatique et sur la vitesse de réponse des stomates. En plus du contrôle génétique qui est exercé sur les différentes variables, l'environnement influence également ces variables, pendant le développement dans le cas des caractéristiques anatomiques ou au jour le jour dans le cas de la conductance stomatique par exemple. Les mécanismes biologiques du fonctionnement et du développement des stomates ne sont pas présentés figure 4 mais ils ont une importance cruciale et sont présentés dans le paragraphe I.4.

## ***1.4 Mécanismes biologiques du développement et du fonctionnement des stomates***

Concernant le fonctionnement des stomates, l'ouverture des stomates est déclenchée par la lumière, notamment la lumière bleue. Elle repose sur la turgescence des cellules de gardes formant l'ostiole

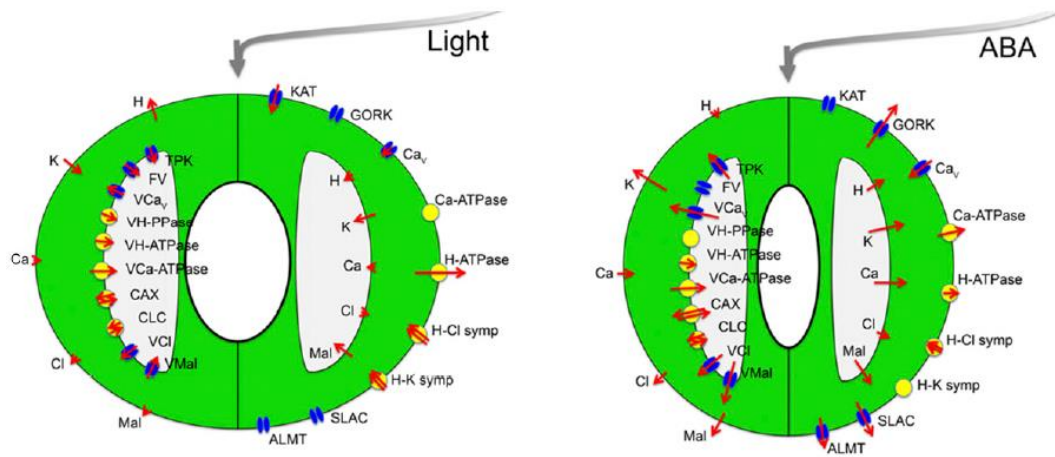


Figure 4 - Processus d'ouverture (à gauche) et de fermeture (à droite) des stomates (Jezek and Blatt, 2017)

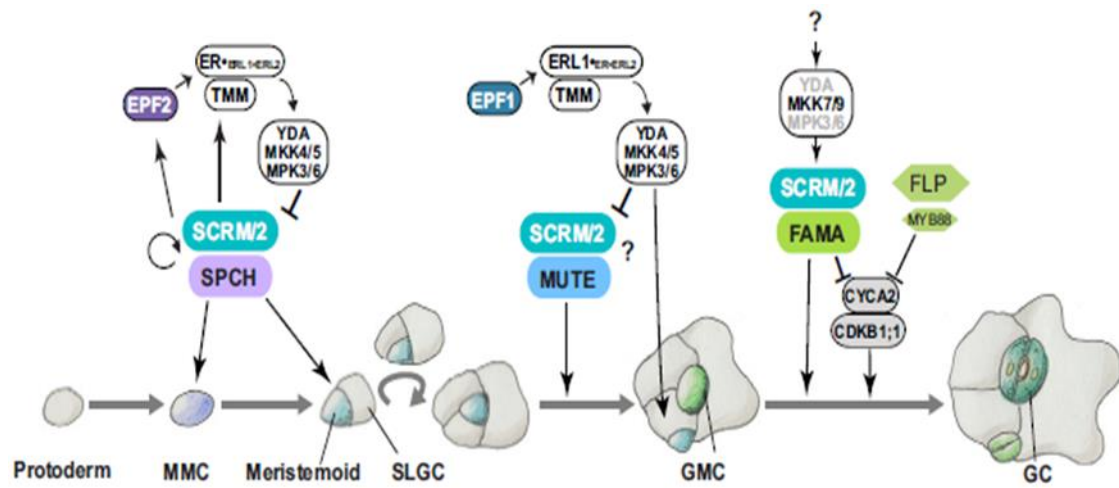


Figure 5 - Stomatal development in Arabidopsis : Cell transitions and key regulatory pathways within the stomatal lineage. (Han and Torii, 2016)

(Jezek and Blatt, 2017). Plus ces cellules sont turgescentes plus les stomates sont ouverts. Ainsi, le contrôle de l'ouverture des stomates repose sur les modifications coordonnées de la turgescence de ces cellules. Cette dernière dépend du potentiel osmotique de la cellule, déterminé par les flux d'ions ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ) et de sucres (malate) à travers la membrane. L'ouverture des stomates repose sur l'accumulation des solutés. Pour la fermeture, le processus d'accumulation est inversé en métabolisant les composés ou en les envoyant dans l'apoplasme. Les cellules de garde matures sont dépourvues de plasmodesmes donc tout le transport de solutés se fait via des transporteurs membranaires. Ainsi, la vitesse de réponse des stomates et l'importance de la réponse aux signaux dépendent du nombre et de l'activité de ces transporteurs (Faralli et al., 2019). L'hormone végétale acide abscissique (ABA) intervient de manière très importante dans le signal de fermeture des stomates (Jezek and Blatt, 2017), notamment en cas de stress hydrique (figure 4), via l'exercice d'un contrôle de certains transporteurs membranaires des cellules de garde. En effet, sur les 8 principaux types de transporteurs positionnés au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde, 5 sont directement activés par l'ABA.

Il est délicat de travailler sur les transporteurs pour améliorer la réactivité du système car ils interagissent entre eux, ce qui résulte en des propriétés émergentes qu'on ne peut pas prévoir en les considérant au cas par cas. Bien que l'acide abscissique soit le facteur le plus important de la fermeture des stomates, d'autres facteurs tel que le  $CO_2$  et l'obscurité peuvent provoquer la fermeture.

Pour ce qui est du processus de développement stomatique, qui définit la densité stomatique, ce dernier est bien caractérisé chez *Arabidopsis* (Bergmann and Sack, 2007; Pillitteri and Torii, 2012; Torii, 2015; Han and Torii, 2016) et est régulé par 3 facteurs de transcriptions principaux (figure 5): le facteur de transcription SPEECHLESS (SPCH) associé à la protéine SCREAM (SCRM/2) dirige la transition de cellule mère méristémoïde à cellule méristémoïde. Ces deux gènes amplifient leur propre expression et induisent l'expression du peptide EPF2 qui *in fine* est un inhibiteur de SCRM/2 et SPCH pour éviter aux cellules voisines de démarrer une lignée stomatique. La transition cellule méristémoïde – cellule de garde mère est ensuite dirigée par un complexe SCRM/2 - MUTE. Cette différenciation est inhibée par le peptide EPF1, ce qui permet d'avoir plusieurs cycles de divisions asymétriques avant la transition. Enfin, le passage de la cellule de garde mère aux deux cellules de garde se fait grâce à l'association de FAMA et SCRM/2. Les protéines sont régulées par les cascades de phosphorylation dues aux MAPK. L'effet des protéines est dilué lors de la croissance des cellules épidermiques qui agrandit la surface de la feuille (et donc diminue la densité stomatique).





## 2 Question de recherche et objectif du stage

Si les acteurs moléculaires du développement stomatique qui contrôlent la densité stomatique sont bien connus chez *Arabidopsis*, on connaît moins bien leur pertinence chez les espèces cultivées, dont la vigne, chez qui la problématique de l'efficacité d'utilisation de l'eau est très importante dans le contexte du changement climatique. La densité stomatique et la taille des stomates conditionnant la conductance stomatique et par ce biais la  $WUE_i$ , il apparaît indispensable de s'intéresser au déterminisme de ces caractères en parallèle de la dynamique de transpiration diurne et nocturne. On aboutit ainsi à la question de recherche suivante :

**Quel est le déterminisme génétique des caractéristiques anatomiques des stomates de la vigne, et leur contribution à la dynamique journalière de transpiration ?**

Le déterminisme de la densité stomatique a déjà été étudié chez d'autres espèces que la vigne via une GWAS (Genome Wide Association Study) : McKown et al. (2014, 2019) et Chhetri et al. (2019) sur le peuplier de l'Ouest, Allwright et al. (2016) sur le peuplier noir, Dittberner et al. (2018) sur *Arabidopsis*, et Yates et al. (2018) sur le blé. Des associations phénotype – génotype ont été trouvées pour certaines (peuplier de l'Ouest, peuplier noir et blé) mais pas dans tous les cas. La GWAS ne permet de détecter des associations que s'il y a assez de variabilité pour le caractère considéré. Or, plusieurs études ont montré qu'il existait de la variabilité pour la densité stomatique chez la vigne (Gómez-del-Campo et al., 2003; Rogiers et al., 2009). Rogiers et al. (2009) ont comparé 10 génotypes pour lesquels la densité stomatique variait entre 160 et 230 stomates par  $mm^2$ . D'après Gómez-del-Campo et al. (2003), la densité stomatique chez la vigne est généralement comprise entre 130 et 250 stomates par  $mm^2$ . Ces éléments sont en faveur d'une étude d'association pour ce caractère chez la vigne, ce qui n'a jamais été fait. Un panel d'association de 279 génotypes sera utilisé (Nicolas et al., 2016). Des empreintes épidermiques de feuilles seront réalisées afin de déterminer la densité et la taille stomatique de chaque génotype. En amont, des mesures de transpiration diurne et nocturne auront été réalisées sur les mêmes feuilles. Une GWAS permettra de rechercher les associations éventuelles entre le phénotype observé et le génotype.



## **3 Matériels et méthodes**

### ***3.1 Matériel végétal et culture des plantes***

Un panel d'association comportant 279 cultivars est utilisé. Ces cultivars peuvent être répartis entre trois groupes selon leur usage et leur origine géographique : raisin de cuve est, raisin de cuve ouest et raisin de table est. Le panel utilisé a été créé pour capturer la diversité génétique et phénotypique existant chez la vigne (Nicolas et al., 2016). Les plantes ont été bouturées en 2018 à Montpellier SupAgro. Le choix de ne pas greffer résulte de considérations pratiques (opération fastidieuse) et biologiques (permet de s'affranchir des interactions porte-greffe x cépage). Les plantes sont cultivées en pots de 3L. Les 10 individus d'un même génotype sont regroupés (pas de randomisation à l'échelle de la pépinière). Les génotypes sont organisés en 8 rangs. Chaque génotype présent sur le rang a 5 pots placés dans une orientation à l'est et 5 pots orientés à l'ouest. La conduite est réalisée de manière à ne garder qu'un seul rameau primaire. Les grappes sont systématiquement coupées car tous les génotypes ne produisent pas leurs fruits au même moment, ce qui aurait créé une source de variation supplémentaire. La culture des plantes est gérée selon des pratiques standard incluant la taille, la fertilisation, l'irrigation ainsi que des mesures phytosanitaires contre l'oïdium et le mildiou.

### ***3.2 Prélèvement des feuilles et mesure de transpiration***

Chaque jour, un prélèvement d'une feuille par génotype sur 70 génotypes a été réalisé. Pour éviter le phénomène de cavitation qui aurait compromis les mesures de transpiration, le pétiole de la feuille était immédiatement placé dans l'eau une fois la feuille détachée de la plante, puis recoupé sous l'eau. Le pétiole était ensuite glissé dans un tube rempli de sève artificielle. Une pâte (Terostat) placée autour du pétiole sur le bouchon du tube empêchait l'évaporation, de sorte à ce que toute perte en eau puisse être attribuée à la seule transpiration foliaire. Une fois le prélèvement réalisé, les feuilles étaient emmenées à l'automate de phénotypage Phenopsis (Granier et al., 2006) où les tubes étaient placés et maintenus dans des pots adaptés à l'automate. L'orientation des feuilles était choisie de manière à éviter tout chevauchement entre feuilles qui auraient gêné la mesure. La température était maintenue à 25 °C, le déficit de pression de vapeur (VPD) à 1.5 kPa (correspondant à une humidité relative de 55%), et le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) à 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le régime photopériodique était semblable à celui de l'extérieur, avec 14 heures de jour pour 10 heures de nuit.



Figure 6 - Zones de prélèvement des empreintes épidermiques (ellipses rouges)

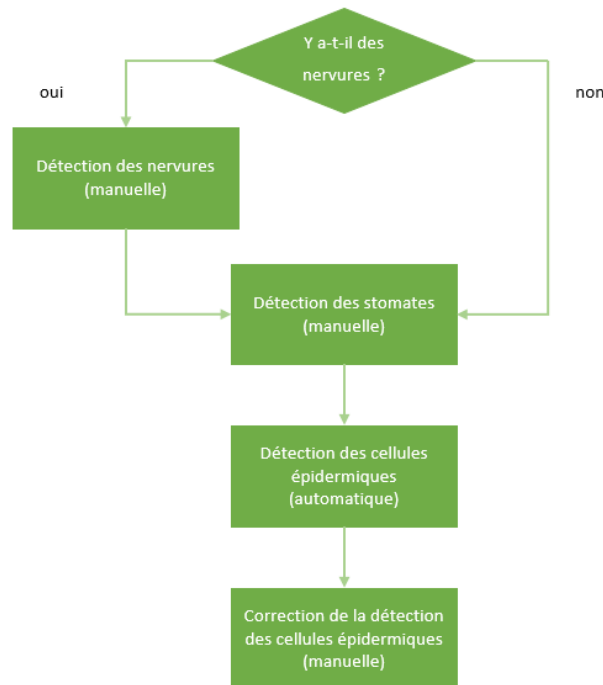


Figure 7 - Principe de fonctionnement de la macro d'analyse d'images

Tableau 1 - Caractéristiques mesurées à partir des empreintes épidermiques

<b>Caractéristiques stomatiques</b>	Densité stomatique	Densité stomatique aréolaire	Indice stomatique aréolaire	Surface des stomates	Longueur des stomates	Largeur des stomates
<b>Caractéristiques des cellules épidermiques</b>	Surface des cellules	Ratio d'aspect	Rondeur	Circularité	Solidité	Densité de cellules aréolaire

Pour la mesure de transpiration elle-même, le poids de chaque pot avec feuille a été mesuré à l'aide d'une balance mobile avec une fréquence de 25 min, de jour comme de nuit. Dans le cadre de ce rapport, la transpiration diurne (resp. nocturne) a ensuite été calculée en divisant la différence de poids entre début et fin de jour (resp. nuit) par la différence de temps et par la surface de la feuille. Cette dernière a été obtenue par un scan de la feuille aplatie (et découpée lorsque nécessaire, i.e. en cas de chevauchement entre lobes) suivi d'une analyse automatique de l'image (Python).

### **3.3 Empreintes épidermiques**

Les empreintes ont été réalisées sur les feuilles prélevées la veille, dont la transpiration avait été mesurée pendant 24h. Les feuilles étaient placées dans un cabinet qui permet de réguler le VPD, la température et le PAR afin de maintenir les stomates ouverts (facilite la détection ultérieure). La zone utilisée pour les empreintes se situait sur la face abaxiale (la vigne étant hypostomatique), à la base des feuilles dans l'espace délimité par la nervure latérale inférieure et par la première ramification de la nervure latérale supérieure (figure 6 ; (Gago et al., 2019)). Cette zone pouvait être située indifféremment d'un côté ou l'autre de la feuille. La zone était épilée (scotch) si la feuille n'était pas glabre, puis du vernis transparent (Maybelline) était appliqué. Après 10 min de séchage, le vernis était décollé à l'aide d'un morceau de scotch et collé sur une lame. Dans certains cas, le vernis était absorbé ce qui ne permettait pas de réaliser l'empreinte épidermique. A ce moment-là, de la pâte dentaire (Président) était appliquée sur une zone épilée, laissée sécher pendant 5 min puis décollée. Ensuite, une couche de vernis était appliquée sur la face du moule formé par la pâte dentaire qui était en contact avec la feuille. Après séchage du vernis pendant 10 min, l'empreinte était décollée au scotch puis collée sur la lame. Les lames ont été observées et photographiées manuellement à l'aide d'un microscope optique (Leica) au grossissement x10. C'est à partir de ces images que les mesures des caractéristiques anatomiques de l'épiderme ont été faites.

### **3.4 Analyse d'images**

Le but de l'analyse d'image était d'accéder aux données suivantes : la surface des nervures sur la zone étudiée, le nombre de stomates, la taille (longueur, largeur et surface de l'ellipse approximant le stomate) de chaque stomate (Tableau 1). La surface des cellules épidermiques, leur nombre ainsi que des paramètres de forme caractérisant l'aspect circulaire et l'aspect allongé des cellules ont été mesurés (Tableau 1). Ces mesures ont été effectuées grâce à une macro ImageJ écrite au cours du stage installée sur le logiciel Fiji qui fonctionne selon le schéma en figure 7.

La première étape consiste à détecter les zones de l'image correspondant à des cellules épidermiques sous-jacentes à des nervures mineures. En effet, celles-ci ont une forme particulière, allongée dans la direction de la nervure, et sont très rarement porteuses de stomates. Cela suggère



que des mécanismes développementaux spécifiques sont à l'œuvre dans ces zones impactées par le réseau vasculaire sous-jacent (Fox et al., 2018). Il convenait donc de distinguer ces différentes zones, de sorte à concentrer notre caractérisation morphologique au niveau des aréoles, i.e. les zones délimitées par les nervures mineures. Cela nous a également permis d'accéder à des informations au niveau aréolaire (Tableau 1), ce qui apparaît plus pertinent au niveau développemental. En effet la densité stomatique et surtout l'indice stomatique, qui traduit l'importance de la production de stomates lors des divisions cellulaires successives, ont plus de sens à l'échelle de l'aréole lorsqu'on s'intéresse aux mécanismes de développement de l'épiderme avec la volonté de s'affranchir de l'effet du réseau vasculaire. La densité stomatique « brute » (par unité de surface foliaire), en revanche, a un sens plus physiologique car c'est cette quantité qui est reliée à la transpiration (également calculée par unité de surface foliaire).

Les données générées par la macro sont traitées avec avec le logiciel R 6.1 pour obtenir un tableau rassemblant pour chaque empreinte (donc chaque individu de chaque génotype) les caractéristiques présentées dans le Tableau 1. Le ratio d'aspect correspond au ratio entre la longueur et la largeur du stomate (soit le rapport entre l'axe majeur et l'axe mineur de l'ellipse par laquelle la forme de la cellule épidermique est approximée). Ainsi, le ratio d'aspect caractérise l'aspect plus ou moins allongé de la cellule. La rondeur, pour une ellipse, correspond à l'inverse du ratio d'aspect. La solidité montre le caractère concave ou convexe de la forme considérée. A ces données s'ajoutent les données de transpiration diurne et nocturne pour chaque feuille ainsi que la densité de nervure. On dispose donc de 15 variables mais seuls les résultats de sept d'entre elles (Densité stomatique aréolaire, Surface des stomates, Longueur des stomates, Largeur des stomates, Ratio d'aspect, Transpiration diurne et transpiration nocturne) seront présentés en détail.


Les variables calculées le sont de la manière suivante :

$$Densité\ stomatique\ aréolaire = \frac{Nb_{stomates}}{surface_{totale} - surface_{nervures}}$$

$$Indice\ stomatique\ aréolaire = \frac{Densité\ stomatique\ aréolaire}{Densité\ de\ cellules\ épidermiques\ aréolaire}$$

$$Ratio\ d'aspect = \frac{Axe\ majeur}{Axe\ mineur}$$

$$Rondeur = \frac{4 \times surface}{\pi \times axe\ majeur^2}$$

$$Circularité = \frac{4 \pi \times surface}{périmètre}$$

$$Solidité = \frac{Surface_{cellule}}{Surface_{convexe}}$$



$$\text{Densité de cellules épidermique aréolaire} = \frac{(Surface_{totale} - Surface_{nervures} - Surface_{stomates})}{Surface_{totale} - Surface_{nervures}} \times \frac{nb_{cellules}}{Surface_{totale_{cellules}}}$$

*Tableau 2 - Modèles mixtes testés pour chaque variable*

Modèle 1	variable ~ (1   Genotype)
Modèle 2	variable ~ (1   Genotype) + Opérateur
Modèle 3	variable ~ (1   Genotype) + Opérateur + Orientation_plante
Modèle 4	variable ~ (1   Genotype) + Opérateur + Orientation_plante + Orientation_feuille
Modèle 5	variable ~ (1   Genotype) + Orientation_plante + Orientation_feuille
Modèle 6	variable ~ (1   Genotype) + Orientation_plante
Modèle 7	variable ~ (1   Genotype) + Orientation_feuille

### 3.5 Filtrage des données

Le filtrage des données s'est fait en trois temps. Lors des mesures en imagerie, les opérateurs ont noté quels types de mesure sur quelles images devraient ne pas être pris en compte car suspects (floues, incomplètes...). En effet, la qualité des images ne permettait pas toujours d'être précis et il était parfois impossible de réaliser les mesures correctement. La première étape du filtrage repose sur ces notes en retirant systématiquement les données des variables concernées. La deuxième étape du filtrage consiste en une détection visuelle des données aberrantes en observant la distribution de tout le jeu de données pour le caractère considéré et en éliminant les valeurs indiscutablement aberrantes. La dernière étape se fait génotype par génotype selon la méthode de Hampel : pour chaque génotype, les valeurs supérieures n'appartenant pas à l'intervalle constitué par la médiane plus ou moins 2 déviations absolues de médiane sont éliminées.

### 3.6 GWAS

L'héritabilité au sens large des variables étudiées ainsi que l'héritabilité du dispositif (prenant en compte le nombre de répétitions) ont été calculées à l'aide du package R heritability 1.2 en utilisant un modèle mixte prenant en compte le génotype en effet aléatoire et un ou plusieurs autres facteurs en effet fixe. Ce modèle est également utilisé pour estimer les valeurs génotypiques en calculant les BLUPs (Best Linear Unbiased Predictors) des génotypes qu'on utilisera pour réaliser l'analyse de génétique d'association. Pour chaque variable, différents modèles ont été testés (Tableau 2). Les hypothèses d'homocédasticité, d'espérance nulle et de normalité à vérifier sur les résidus ont été contrôlées systématiquement. Un seul modèle par variable a été retenu selon le critère du BIC (Critère d'information bayésien). Le facteur Opérateur correspond à l'opérateur qui a réalisé les mesures des caractères anatomiques en imagerie. Le facteur Orientation\_plante correspond à l'orientation, Est ou Ouest, de la plante dont provient la feuille dans la pépinière. Le facteur Orientation\_feuille décrit l'orientation Est ou Ouest de la feuille indépendamment de l'orientation de la plante dont elle provient (la vigne étant une liane, des feuilles du rang Est ont pu être produites et pousser sur le rang Ouest, et vice-versa).


Des associations génotypes – phénotypes sont recherchées pour les caractères Densité stomatique aréolaire, Surface des stomates, Longueur des stomates, Largeur des stomates, Ratio d'aspect des cellules épidermiques, Transpiration nocturne et Transpiration diurne. L'apparement entre les

génotypes est pris en compte dans le modèle grâce à la matrice d'apparentement calculée dans le script fourni par Timothée Flutre (anciennement dans l'équipe DAAV, AGAP, Montpellier). Cette matrice a été réalisée sur un sous-échantillon des 10 503 marqueurs SNPs à disposition pour l'étude. La structure de la population (ici peu importante, cf. ci-après) n'est pas prise en compte dans le modèle de la GWAS. Ce dernier est présenté en équation 1.

*Équation 1 – Modèle utilisé pour la GWAS avec  $y$  le phénotype,  $x$  la matrice de génotype au marqueur,  $Z$  la matrice de design,  $u$  les valeurs génotypiques et  $e$  la résiduelle qui contient l'apparentement*

$$y = \mu + x\beta + Zu + e$$

Les GWAS ont été réalisées en utilisant un script R fourni par Timothée Flutre et modifié par Aude Coupel-Ledru. Pour éliminer un potentiel effet dû à un allèle présent en très faible fréquence, les SNPs ayant des allèles avec une fréquence allélique mineure (MAF) inférieure à 5% sont éliminés. Les associations détectées sont considérées significatives si leur p-value passe le seuil de Bonferonni pour 5%. Le script fait appel au logiciel GEMMA pour exécuter la GWAS.

Tableau 3 - Intervalles de valeurs des caractères d'intérêt

Densité stomatique aréolaire [Stomates/mm <sup>2</sup> ]	Surface des stomates [μm <sup>2</sup> ]	Longueur des stomates [μm]	Largeur des stomates [μm]	Ratio d'aspect des cellules épidermiques [μm μm <sup>-1</sup> ]	Transpiration nocturne [mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	Transpiration diurne [mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	Transpiration diurne et nocturne [mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
40-240	5941-89281	163-521	77-249	1,127-1,974	0,014-0,184	0,16-1,37	0,10-0,85

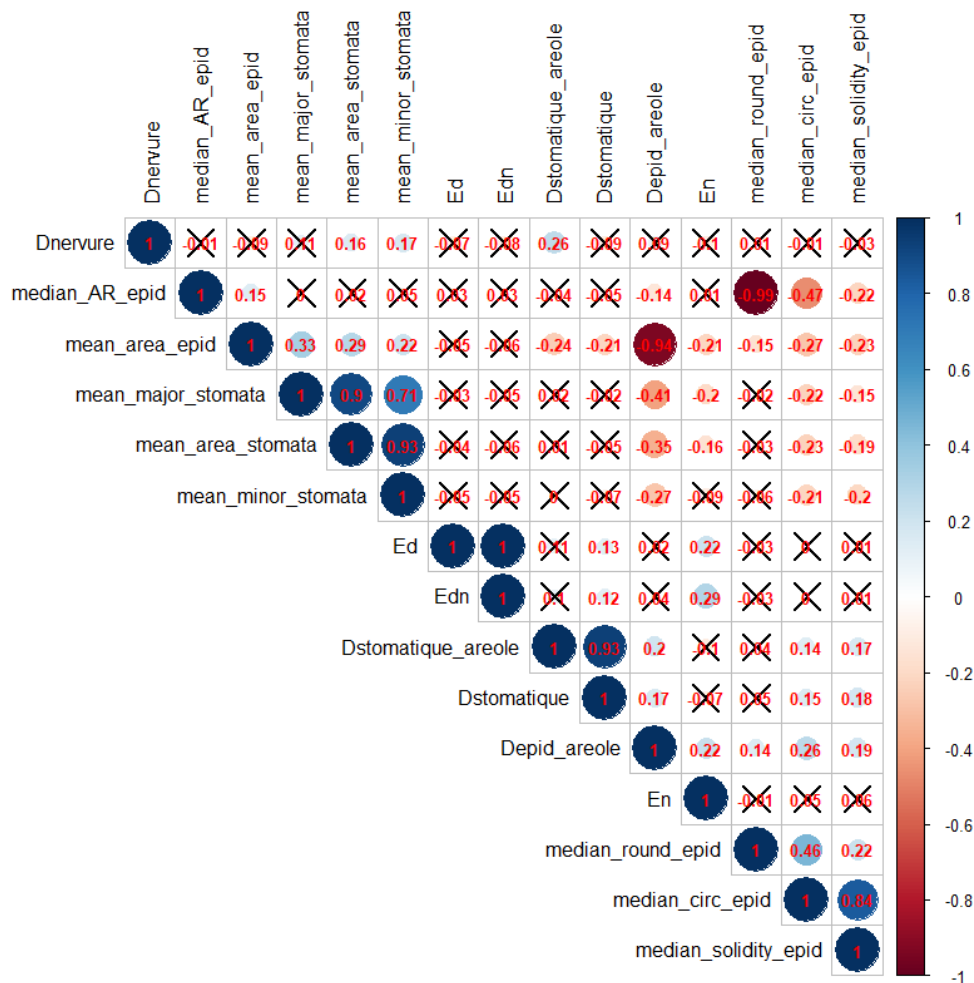


Figure 8 - Matrice de corrélation (SI\_areole=Indice stomatique aréolaire, mean\_area\_stomata=Surface des stomates, mean\_major\_stomata=Longueur des stomates, mean\_minor\_stomata=Largeur des stomates, mean\_area\_epid=Surface des cellules épidermiques, median\_AR\_epid=Ratio d'aspect des cellules épidermiques, median\_round\_epid=Rondeur des cellules épidermiques, median\_circ\_epid=Circularité des cellules épidermiques, median\_solidity\_epid=Solidité des cellules épidermiques)

## 4 Résultats

### 4.1 Résultats sur 5 variables anatomiques et 3 variables de transpiration

#### 4.1.1 Visualisation des données


Le tableau 3 présente la gamme de valeurs des principales variables qui nous intéressaient pour cette étude : la densité stomatique aréolaire, la taille des stomates (surface, longueur, largeur), et la transpiration (diurne, nocturne, totale). Nous présentons également le ratio d'aspect des cellules épidermiques, qui nous intéressait moins a priori, mais pour lequel nous avons détecté une association significative (voir ci-après). La distribution de ces variables est reportée en Annexe 1. Ces gammes sont du même ordre de grandeur que celles relevées dans la littérature, avec notamment une transpiration diurne de 0.16 à 1.37 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, et une transpiration nocturne représentant de 8 à 13% de la transpiration diurne. La densité stomatique aréolaire mesurée est hors de l'intervalle 130 – 250 stomates par mm<sup>2</sup> trouvé dans la littérature.

La Figure 8 présente la matrice de corrélation de l'ensemble des variables mesurées dans cette expérience. Globalement, elle révèle des corrélations triviales entre caractères calculatoirement proches, mais ne permet pas de mettre en évidence les corrélations physiologiques et anatomiques relevées dans la littérature. Ainsi, la densité stomatique aréolaire (variable pertinente pour les processus de développement stomatique) est très corrélée (0,93) à la densité stomatique « brute » (variable pertinente pour la transpiration), ce qui était attendu puisque notre échantillonnage s'est concentré sur des zones de l'épiderme sous-jacent au réseau vasculaire mineur (d'où une faible contribution des cellules affectées par les nervures dans l'image). A contrario, la densité stomatique (aréolaire ou brute) n'est pas corrélée aux variables de dimension des stomates, alors qu'une corrélation négative était attendue. La densité n'est pas non plus corrélée à la transpiration qu'elle soit diurne, nocturne ou sur 24 heures, ce qui est inattendu.

Au niveau des variables de forme de cellules, les corrélations observées sont triviales. Ainsi, les corrélations entre les différents paramètres de forme des cellules épidermiques issus du logiciel ImageJ sont fidèles à leur construction mathématique. Par exemple, il existe une corrélation très fortement négative (-0,99) entre le ratio d'aspect (axe\_majeur/axe\_mineur) et la rondeur ( $4 \cdot \text{surface} / (\pi \cdot \text{axe\_majeur}^2)$ ), i.e. l'inverse du ratio d'aspect), et une corrélation fortement positive (0,84) entre la circularité ( $4\pi \cdot \text{surface} / \text{périmètre}^2$ ) et la solidité ( $\text{surface} / \text{surface\_convexe}$ ). Il en est de même au niveau des stomates, qui lors de l'acquisition des données sont représentés par une ellipse dotée d'une certaine longueur (axe majeur) et largeur (axe mineur). Ainsi, et sans surprise,

la surface des stomates est très corrélée avec leur largeur (0,94) et leur longueur (0,90). La largeur

*Tableau 4 - Héritabilité individuelle et du dispositif des caractères étudiés*

Variable	Modèle	H <sup>2</sup> <sub>dispo</sub>	H <sup>2</sup> <sub>ind</sub>	V(G)	V(r)
Densité stomatique aréolaire	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur	0,68	0,36	325,30	580,78
Surface des stomates	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	0,59	0,22	39720911,19	143992362,06
Longueur des stomates	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	0,64	0,25	659,87	1986,97
Largeur des stomates	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	0,56	0,20	173,80	709,10
Ratio d'aspect des cellules épidermiques	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant	0,64	0,26	0,0043	0,0124
Transpiration nocturne	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur_prelevement + Orientation_plant + Orientation_leaf	0,76	0,38	0,0002	0,0003
Transpiration diurne	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur_prelevement	0,68	0,29	0.0095	0.0237
Transpiration sur 24h	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur_prelevement	0,68	0.29	0.0034	0.0085



est également bien corrélée à la longueur des stomates (0,71). En revanche, la surface des stomates et la longueur des stomates corréleront négativement mais faiblement avec la transpiration nocturne (-0,20 et -0,16). Enfin, et comme attendu, la transpiration diurne et la transpiration nocturne corréleront significativement mais faiblement (0,20).

#### **4.1.2 Héritabilité des caractères**

Nous nous sommes ensuite intéressés plus précisément à l'effet génotypique. Dans cette section et la suivante, nous nous concentrerons sur les variables d'intérêt définies dans le Tableau 3. Plusieurs modèles ont été systématiquement testés pour extraire les BLUPs, et sélectionnés à l'aide du critère BIC. De manière notable, le modèle retenu varie selon le caractère (Tableau 4). Si cela est biologiquement plausible, l'explication sous-jacente n'est pas toujours évidente. Cependant, il était rare que le critère BIC discrimine clairement le meilleur modèle du second voire du troisième modèle. Nous y reviendrons dans la section 4.2. L'héritabilité du dispositif et l'héritabilité individuelle sont présentées dans le Tableau 4 pour chaque caractère, ainsi que les variances génétique et résiduelle associées. L'héritabilité du dispositif est autour de 60-70% pour tous les caractères ce qui donne confiance dans le dispositif expérimental utilisé d'un point de vue répétabilité. L'héritabilité individuelle est modeste, entre 0,20 et 0,38 selon le caractère, ce qui montre que la variance génétique représente une part non négligeable de la variance phénotypique mais que d'autres facteurs, environnementaux par exemple, ont une importance non négligeable dans l'établissement du phénotype.

#### **4.1.3 Résultats de la GWAS**

Nous avons ensuite exploré le déterminisme génétique de chacun de ces caractères au travers d'une analyse d'association. Les Figures 9 à 13 présentent les Manhattan plots des caractères anatomiques et les Figures 14 à 16 les Manhattan plots pour les transpirations. Si des pics se dessinent, aucun d'entre eux ne franchit le seuil de Bonferroni sauf pour le ratio d'aspect des cellules épidermiques, variable qui ne présentait que peu d'intérêt dans le cadre de notre étude.

Au lieu d'explorer certains SNPs plus en détail, nous avons souhaité revenir sur l'exploration des données brutes après avoir remarqué que l'effet opérateur était systématiquement retenu dans nos modèles.

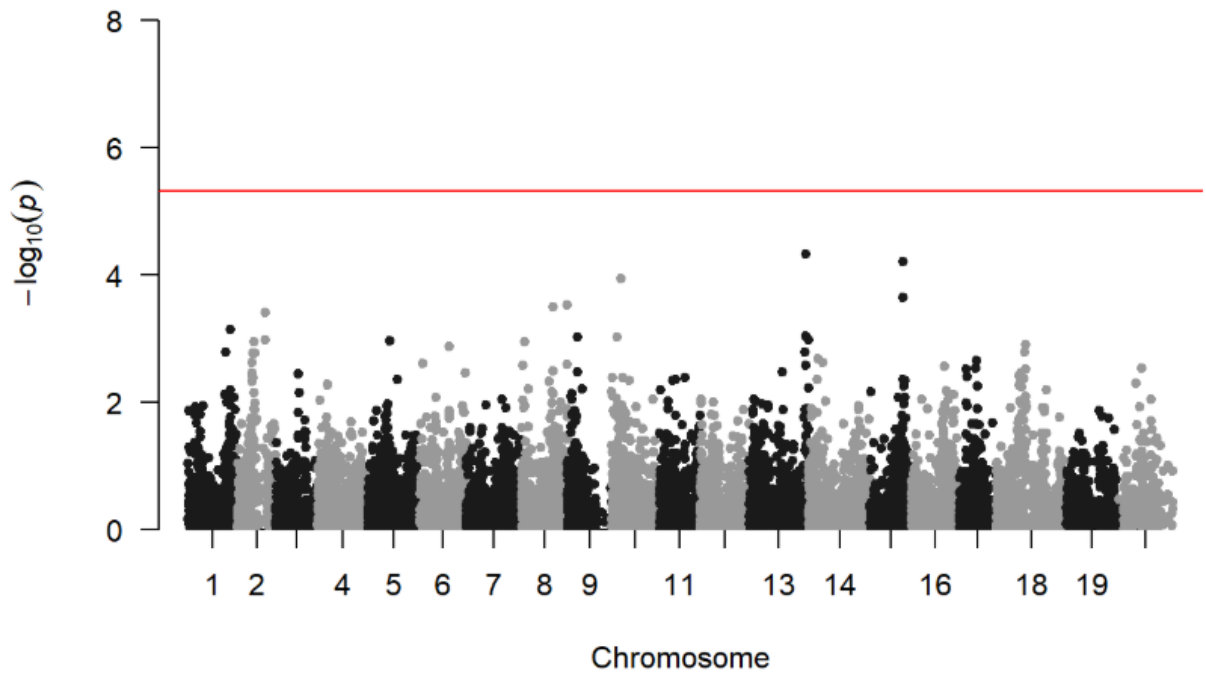


Figure 9 - Manhattan plot pour la densité stomatique aréolaire (seuil de Bonferroni en rouge)

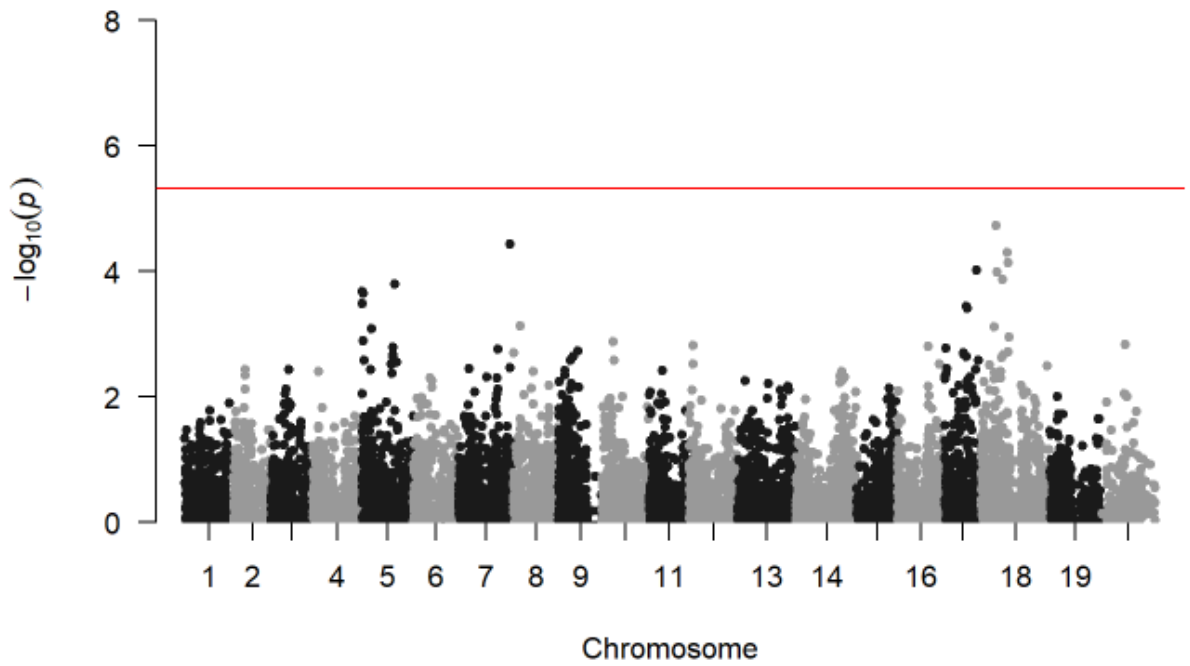


Figure 10 - Manhattan plot pour la surface des stomates (seuil de Bonferroni en rouge)



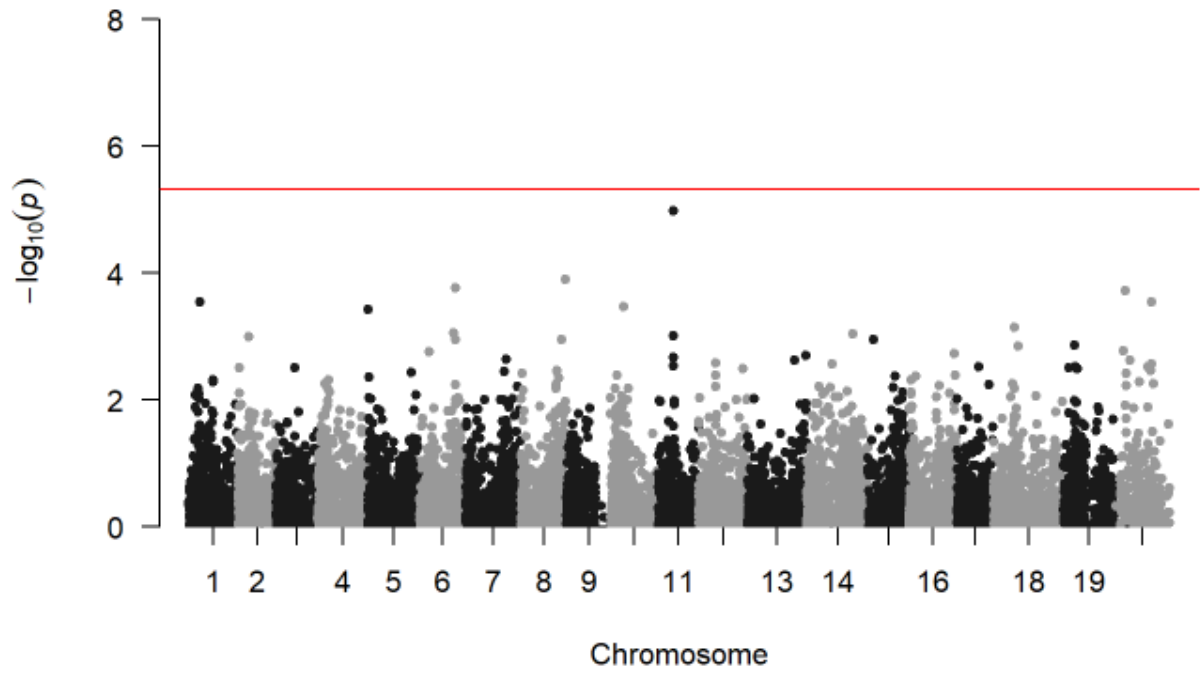


Figure 11 - Manhattan plot pour la longueur des stomates (seuil de Bonferroni en rouge)

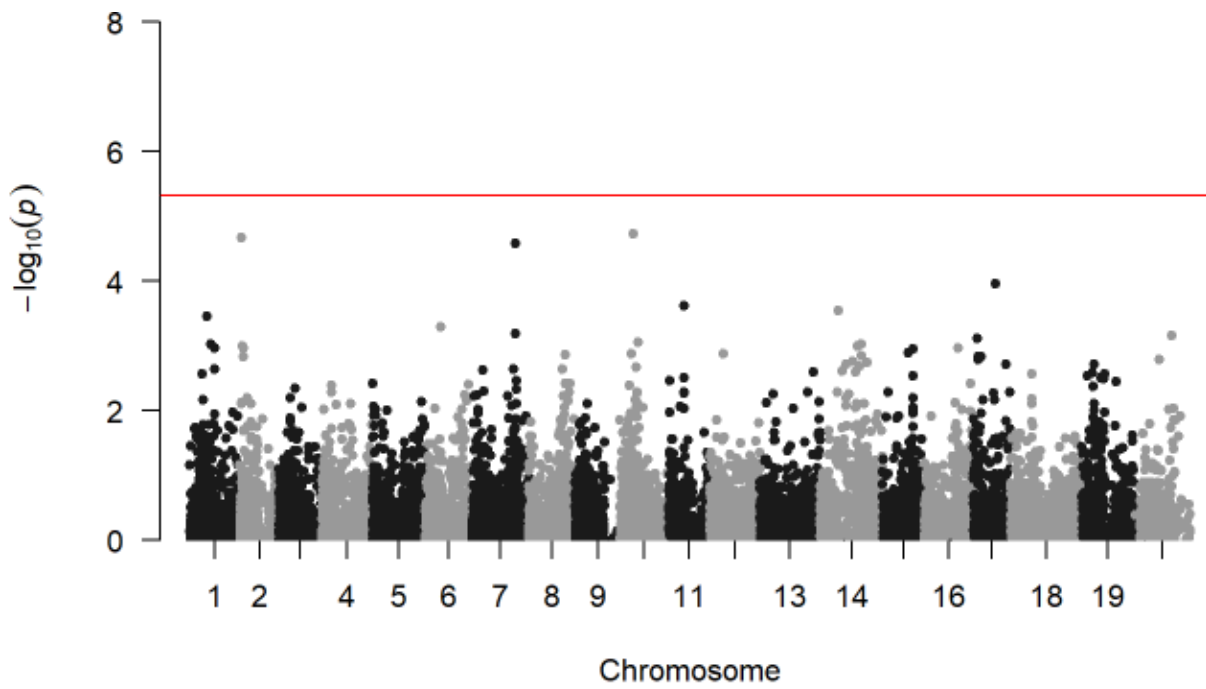


Figure 12 - Manhattan plot pour la largeur des stomates (seuil de Bonferroni en rouge)



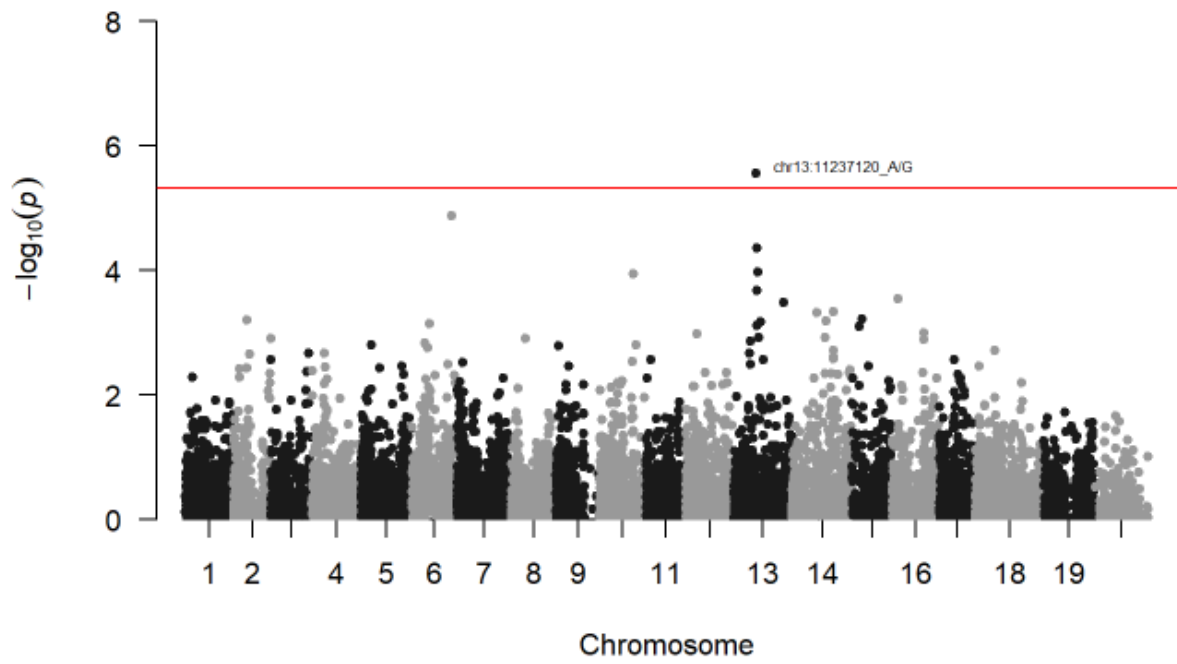


Figure 13 - Manhattan plot pour le ratio d'aspect des cellules épidermiques (seuil de Bonferroni en rouge)

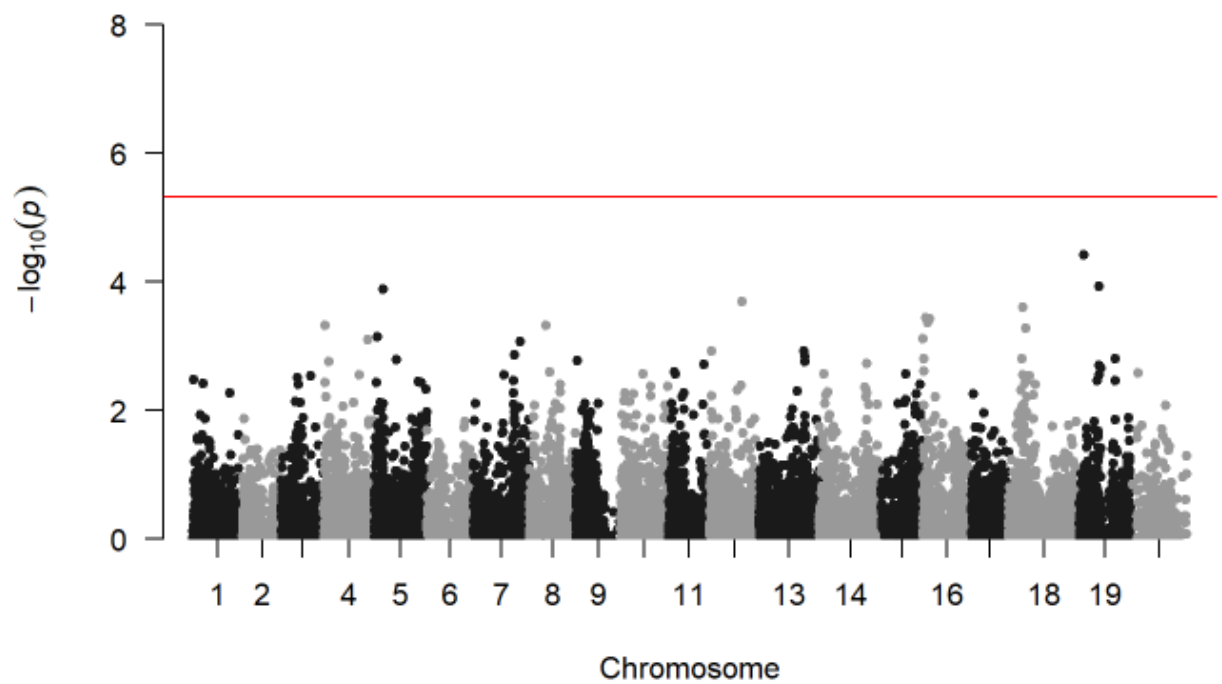


Figure 14 - Manhattan plot pour la transpiration diurne (seuil de Bonferroni en rouge)



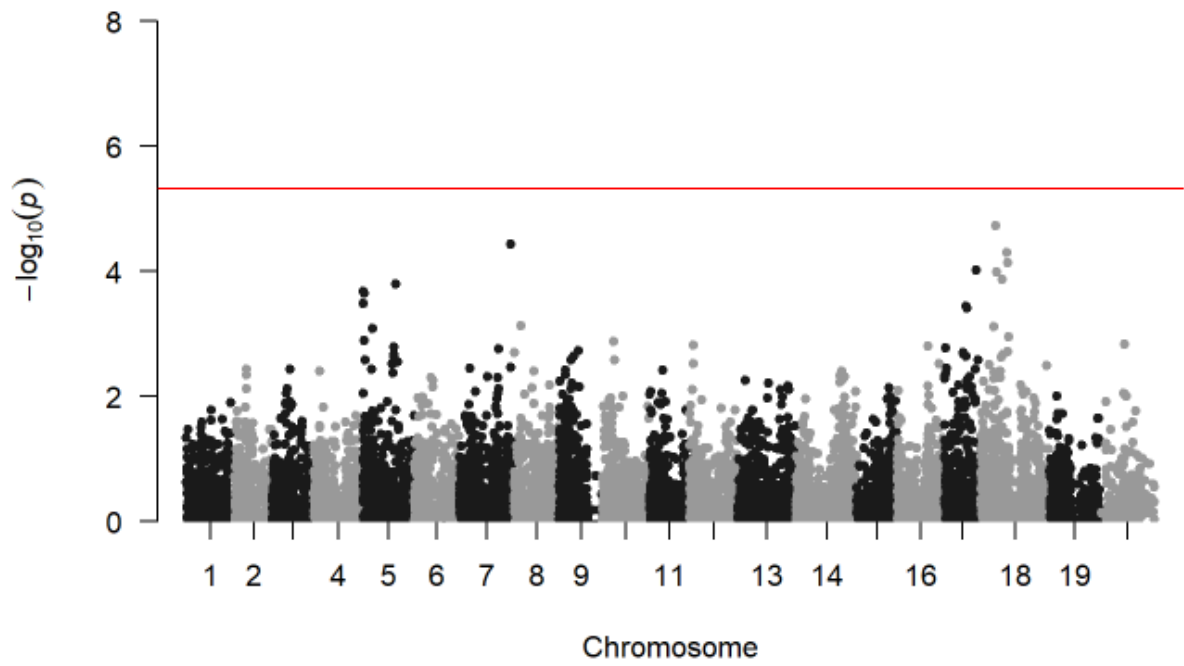


Figure 15 - Manhattan plot pour la transpiration nocturne (seuil de Bonferroni en rouge)

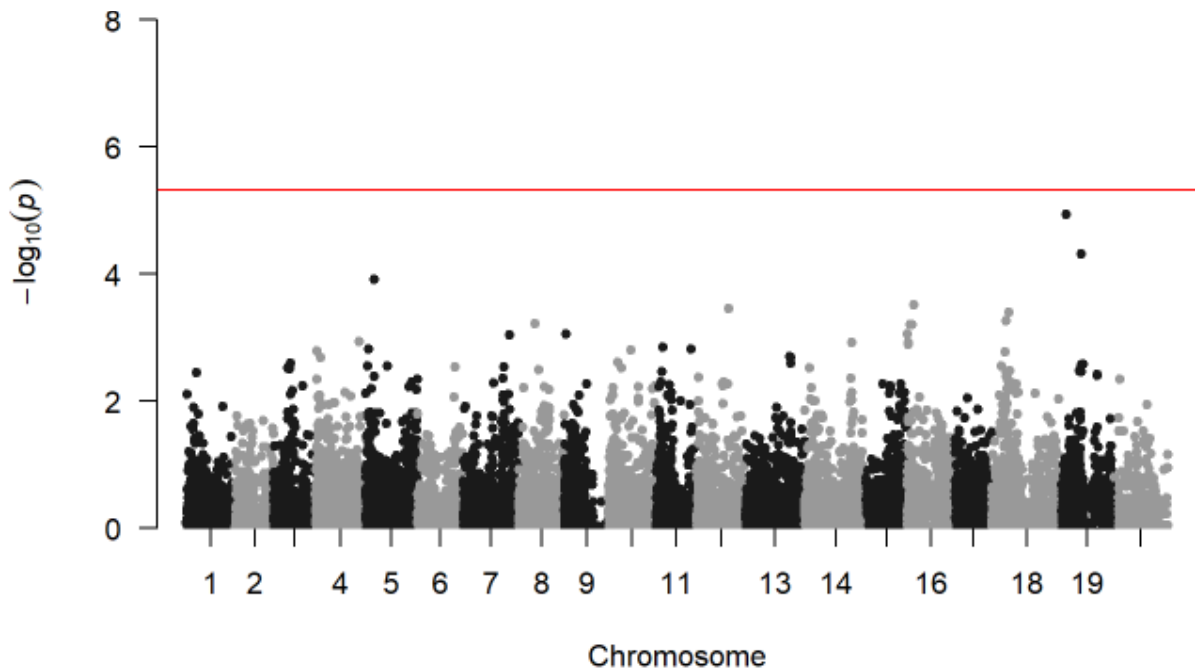


Figure 16 - Manhattan plot pour la transpiration sur 24 heures (seuil de Bonferroni en rouge)





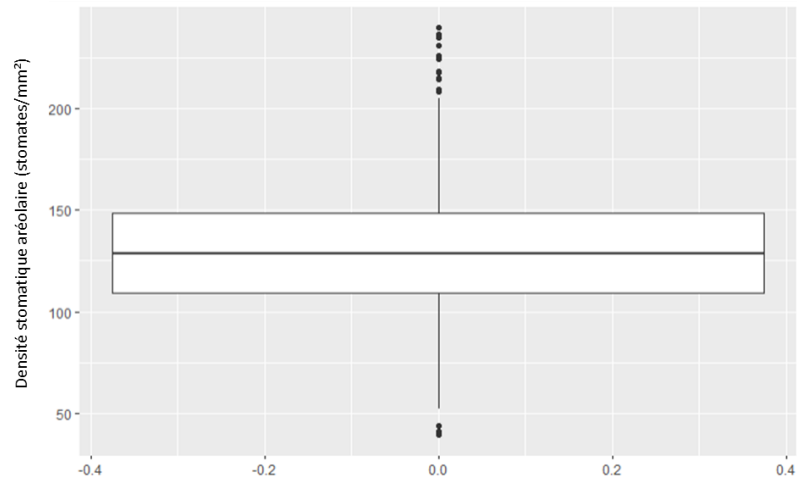


Figure 17 - Distribution de la densité stomatique aréolaire dans le premier cas de gestion des données

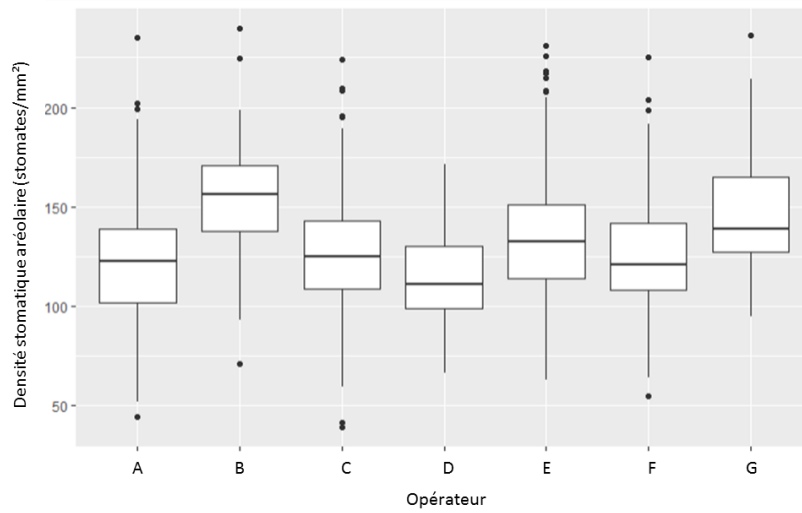


Figure 18 - Boxplots de la densité stomatique aréolaire selon l'opérateur en imagerie

Tableau 5 - Comparaison des modèles mixtes testés

Modèle	Description du modèle	BIC	H <sup>2</sup> <sub>dispo</sub>	H <sup>2</sup> <sub>ind</sub>	V(G)	V(r)
mod2	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur	10004,32	0,68	0,36	325,30	580,78
mod3	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant	10009,76	0,67	0,35	338,09	622,24
mod4	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	10016,32	0,67	0,35	336,83	620,81
mod7	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_leaf	10042,61	0,67	0,35	334,72	625,31
mod1	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar)	10044,76	0,67	0,35	340,44	629,42
mod5	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant + Orientation_leaf	10047,94	0,67	0,35	335,78	624,18
mod6	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant	10049,08	0,67	0,35	337,27	629,30

## **4.2 Questionnement sur la gestion des données : exemple de la densité stomatique aréolaire et de l'effet opérateur**

Plusieurs opérateurs ont participé aux travaux d'imagerie mais tous n'ont pas pu traiter tous les génotypes. L'opérateur C et l'opérateur E ont traité 72% des échantillons à eux deux et l'opérateur C'est le seul à avoir traité tous les génotypes au moins une fois. A priori, si l'opérateur a bel et bien un effet sur la valeur de la variable anatomique mesurée, l'effet du génotype et de l'opérateur seront partiellement confondus pour les opérateurs n'ayant pas traité tous les génotypes. Cependant, éliminer d'office toutes les observations n'ayant pas été réalisées par des opérateurs n'ayant pas fait tous (ou presque tous) les génotypes représente une perte d'information importante. Par exemple, si on ne garde que les deux opérateurs principaux, on passe de 1211 observations à 778. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'impact de la gestion des données par rapport à l'opérateur sur les analyses génétiques menées, en retenant la densité stomatique aréolaire pour étude de cas. En première approche, l'intégralité du jeu de données a été conservée pour débiter les analyses.

### **4.2.1 Première approche : garder tous les opérateurs pour maximiser le nombre d'observations**

Le phénotypage a permis de récolter 1211 observations de densité stomatique aréolaire sur l'intégralité des génotypes. Sur ces 1211 observations, 31 ont été éliminées d'office car connues fausses, puis 133 autres ont été supprimées suivant la méthode de Hampel. 1047 observations au total ont été conservées pour la suite des analyses. La distribution pour ce jeu de données est présentée en Figure 17. Comme mentionné dans la partie 4.1.1, les valeurs s'étendent de 40 à 240 stomates par mm<sup>2</sup> avec une moyenne de 130 stomates par mm<sup>2</sup>.

L'observation des boxplots de densité selon l'opérateur (Figure 18) semble indiquer une différence entre les opérateurs. Cela n'est pas surprenant car tous les opérateurs n'ayant pas traité tous les génotypes, un effet génotype peut venir se confondre avec un effet opérateur.

Lors de la comparaison des différents modèles mixtes possibles pour extraire les valeurs génotypiques (Tableau 5), le meilleur modèle selon le critère du BIC s'est révélé le modèle 2 prenant en compte le génotype en facteur aléatoire et l'opérateur en effet fixe. C'est également le modèle qui donne la meilleure héritabilité individuelle (0,36) et du dispositif (0,68). Le fait que le meilleur modèle et les deux suivants intègrent l'opérateur pouvait être attendu grâce aux observations précédentes sur la figure 18.

--	--	--	--	--	--	--

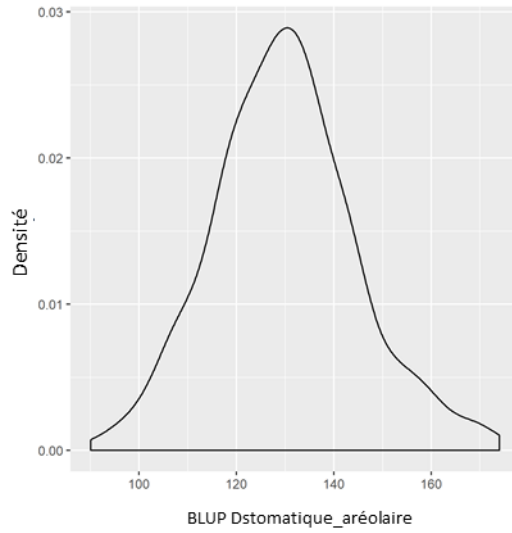



Figure 19 - Distribution des BLUPs de densité stomatique aréolaire

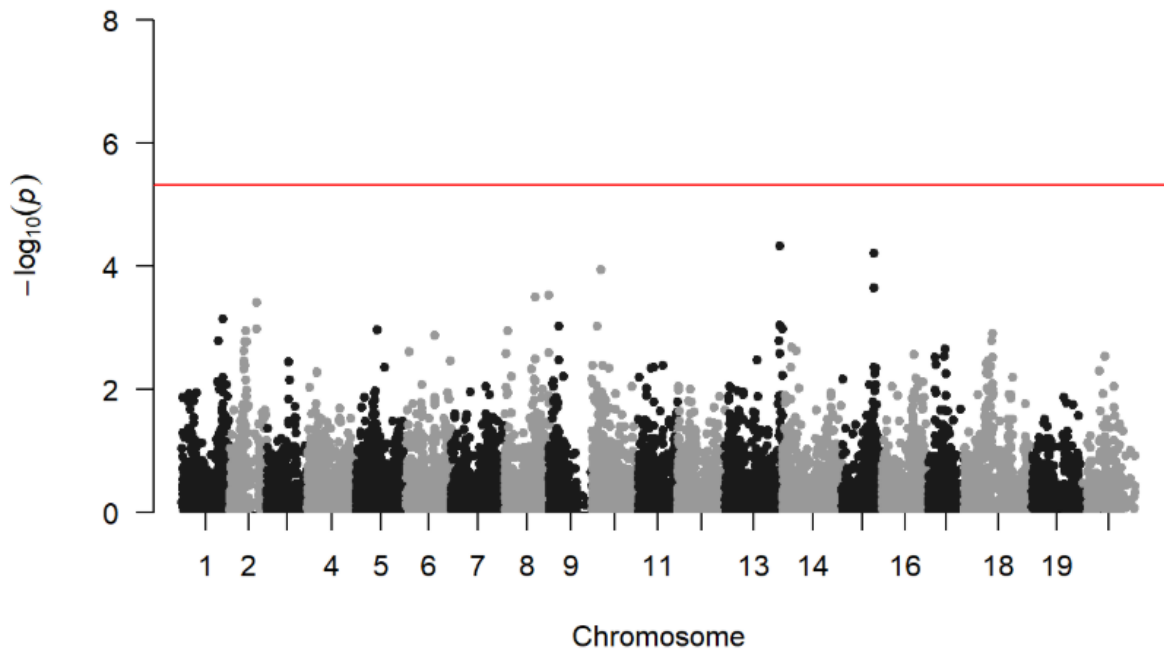


Figure 20 - Manhattan plot des associations pour la densité stomatique aréolaire dans le premier cas de gestion des données, identique à la Figure 10, pour le confort du lecteur.

La distribution des valeurs génotypiques issues du modèle 2 est bien normale (Figure 19).

La figure 20 montre le résultat de l'étude d'association si ces valeurs génotypiques sont utilisées. Aucune association ne passe le seuil de significativité de Bonferroni bien que des pics semblent se dessiner sur les chromosomes 13 et 15.

Cependant, interpréter les effets de potentiels marqueurs est délicat comme l'effet du génotype et de l'opérateur sur le phénotype sont potentiellement partiellement confondus. Une deuxième approche dans laquelle seuls les deux opérateurs principaux sont conservés a donc été réalisée.

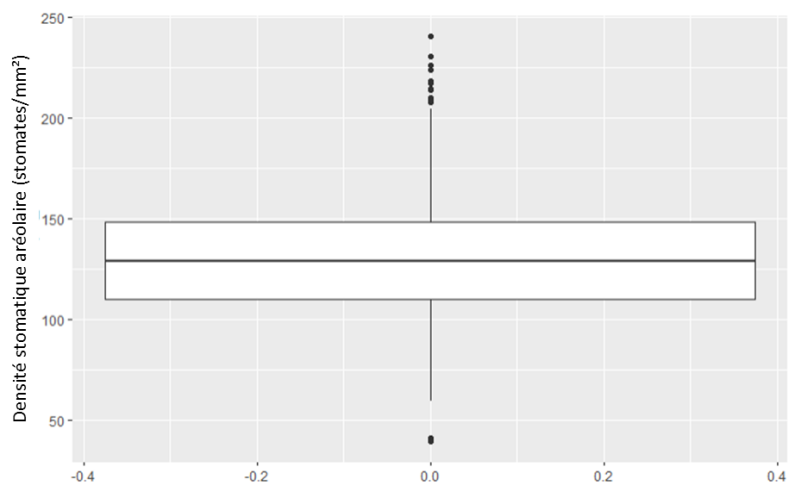


Figure 21 - Boxplot de la densité stomatique dans le deuxième cas de gestion des données

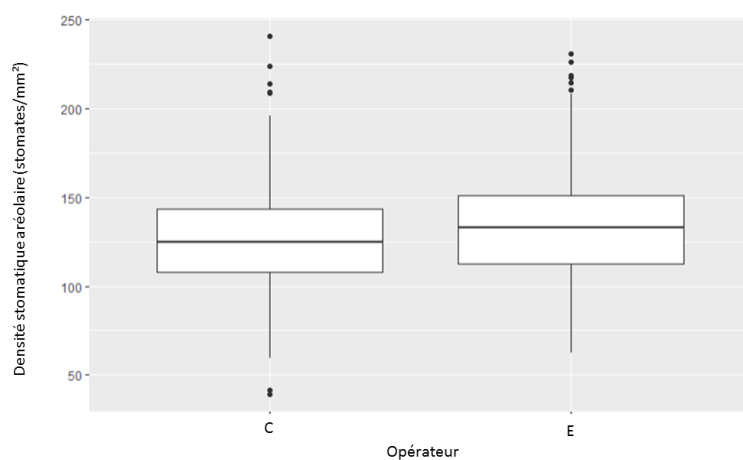


Figure 22 - Boxplots de la densité stomatique selon l'opérateur en imagerie dans le deuxième cas de gestion des données

Tableau 6 - Classement des modèles mixtes testés dans la deuxième approche de gestion des données

Modèle	Description du modèle	BIC	H <sup>2</sup> <sub>dispo</sub>	H <sup>2</sup> <sub>ind</sub>	V(G)	V(r)
mod2	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur	6904,74	0,59	0,36	337,51	610,29
mod1	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar)	6906,24	0,59	0,36	343,29	614,97
mod3	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant	6909,03	0,59	0,36	339,31	607,52
mod7	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_leaf	6909,80	0,59	0,35	337,86	615,27
mod6	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant	6912,65	0,59	0,36	342,23	616,35
mod5	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant + Orientation_leaf	6914,30	0,59	0,35	337,12	614,21
mod4	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	6915,59	0,59	0,36	338,43	608,80

#### **4.2.2 Deuxième approche : ne considérer que le sous-échantillon réalisé par les deux opérateurs principaux pour mieux distinguer l'effet opérateur de l'effet génotype**

Cette fois, le nombre d'observations a été réduit à 778 en ne gardant que les données générées par les deux opérateurs ayant traité le plus d'images, puis à 690 après le filtrage de Hampel et le filtrage des données suspectes. La gamme de valeurs est la même que dans le premier cas avec une valeur minimale de 40, maximale de 240 et moyenne de 130 comme on peut le voir sur la Figure 21, ce qui est assez rassurant : éliminer une partie des observations n'a pas changé la distribution des données.

La comparaison des données produites par les deux opérateurs restant (Figure 22) semble montrer encore un léger décalage entre les opérateurs, potentiellement dû aux 20 génotypes que l'opérateur E n'a pas traités.

La comparaison de modèles mixtes (Tableau 6) a également donné le modèle 2 comme meilleur modèle dans ce cas. Ce qui signifie que l'opérateur garde un effet sur le phénotype. Cependant, cette fois-ci l'écart du BIC entre ce modèle et le premier modèle à ne pas prendre en compte l'effet opérateur est plus petit que dans le cas précédent. Ici les deux valeurs de BIC, respectivement 6904,74 et 6906,24 pour les modèles 1 et 2 sont proches tandis qu'elles sont plus éloignées dans le premier cas avec 10004,32 et 10042,76. L'héritabilité individuelle est de 0,36 comme dans le premier cas, ce qui signifie que le génotype représente toujours la même part de variance du phénotype ce qui est positif. L'héritabilité du dispositif de 0,59, soit plus basse de 0,09 que dans le premier cas. La diminution de l'héritabilité du dispositif s'explique par la diminution du nombre de répétitions par génotype ce qui augmente la part de la variance résiduelle dans cette hérabilité.

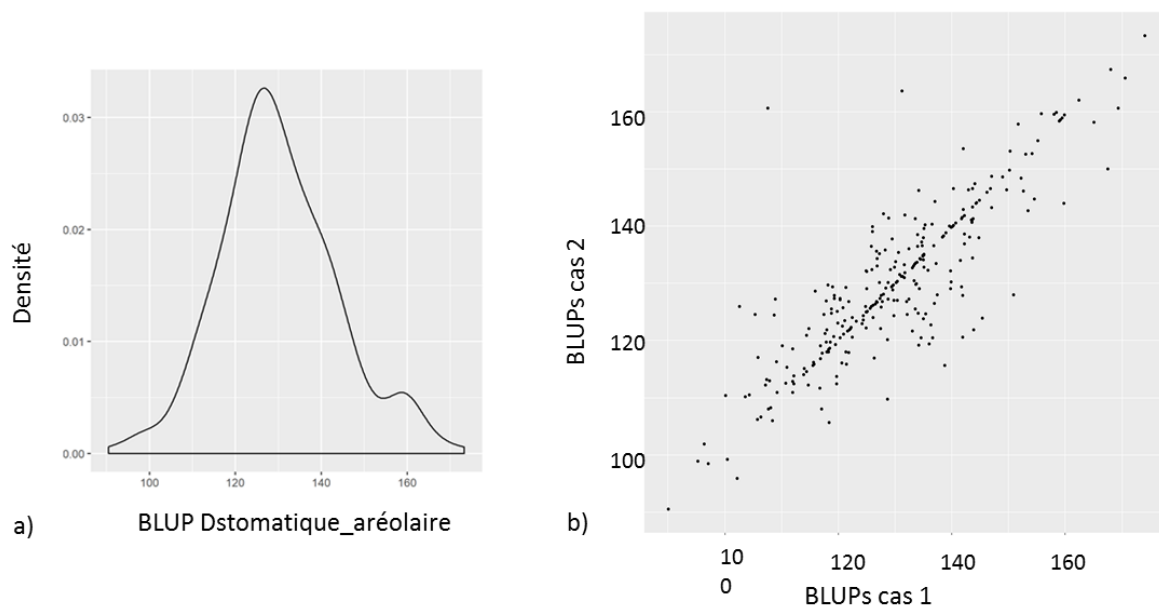


Figure 23 - Distribution des BLUPs du modèle 2 dans le deuxième cas (a), BLUPs utilisés pour le second cas en fonction des BLUPs utilisé pour le premier (b)

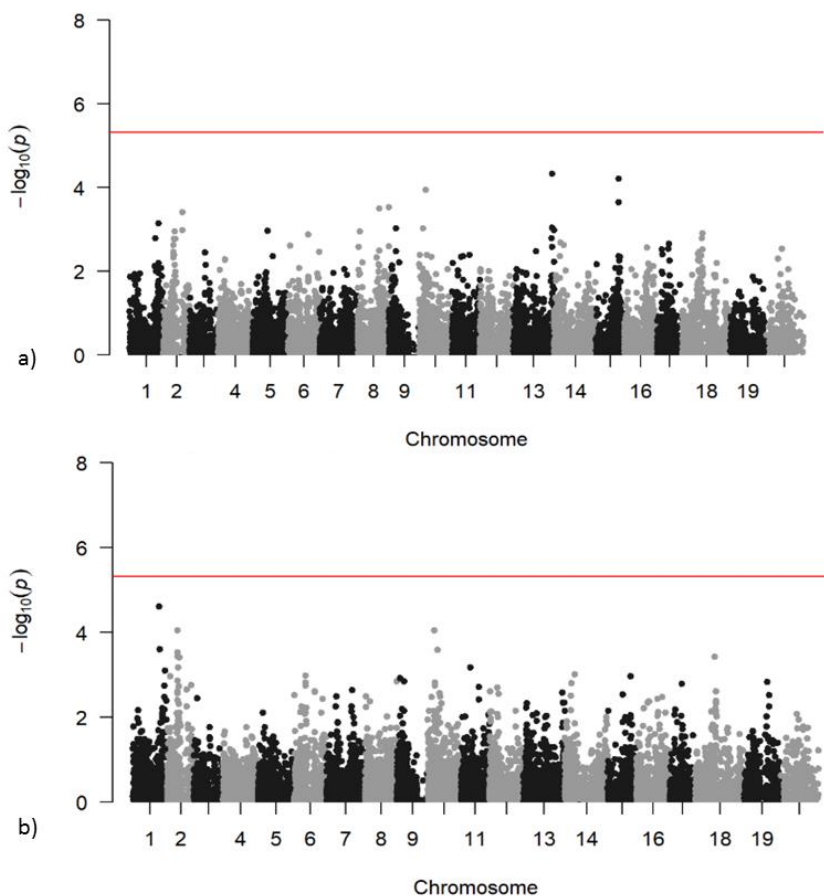


Figure 24 – Comparaison entre le Manhattan plot du premier cas identique à la Figure 10 (a) et du second (b) pour la densité stomatique aréolaire (seuil de Bonferroni en rouge)



Bien qu'on voit apparaître une légère bimodalité dans les BLUPs (figure 23a), les résidus du modèles (annexe 2) sont restés suffisamment conformes aux attendus pour valider le modèle.

La comparaison des deux Manhattan plots (Figure 24) révèle des différences assez notoires : la détection sur les chromosomes 1 et 2 qui ne faisait que s'ébaucher sur le premier Manhattan, s'approche bien plus du seuil de significativité du second tandis que la détection sur les chromosomes 13 et 15 visible sur le premier Manhattan ne l'est plus du tout sur le second. Il existe cependant une corrélation de 0,85 entre les deux jeux de BLUPs utilisés pour réaliser les deux Manhattan plots (Figure 23b).

Nous nous sommes demandés si découpler complètement l'effet opérateur de l'effet génotype en éliminant les génotypes non traités par un des deux opérateurs permettrait d'améliorer la détection. Une troisième et dernière approche a donc été suivie.

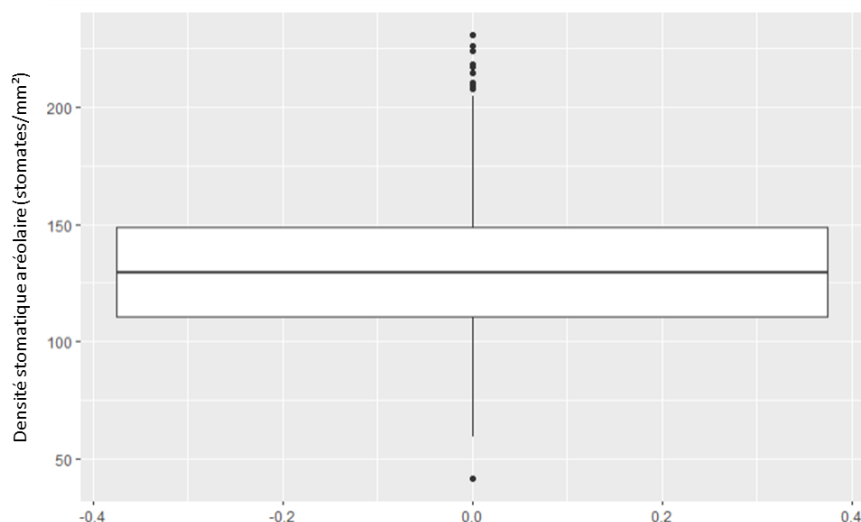


Figure 25 - Boxplot de la densité stomatique aréolaire dans le troisième cas de gestion de données

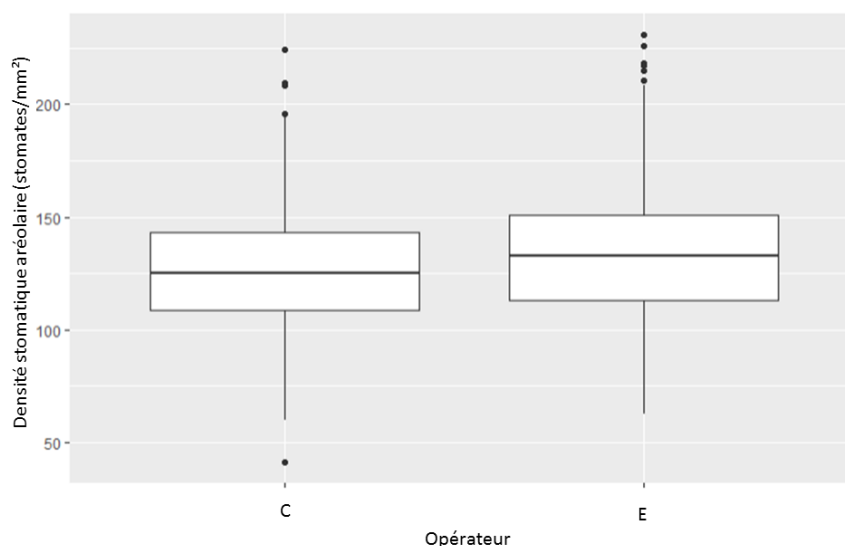


Figure 26 - Comparaison des valeurs de densité stomatique aréolaire selon l'opérateur

Tableau 7 - Classement et description des modèles testés

Modèle	Description du modèle	BIC	H <sup>2</sup> <sub>dispo</sub>	H <sup>2</sup> <sub>ind</sub>	V(G)	V(r)
mod2	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur	6604,05	0,58	0,34	312,50	594,14
mod1	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar)	6606,24	0,59	0,35	319,83	598,97
mod3	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant	6608,05	0,59	0,35	314,52	590,94
mod7	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_leaf	6609,80	0,58	0,34	313,36	599,61
mod6	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant	6612,60	0,59	0,35	318,66	600,33
mod5	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Orientation_plant + Orientation_leaf	6614,46	0,58	0,34	312,15	599,06
mod4	Dstomatique_areole ~ (1   CodeVar) + Operateur + Orientation_plant + Orientation_leaf	6614,56	0,59	0,35	314,42	591,68

### 4.2.3 Troisième approche : changement de population

La troisième et dernière approche retire du jeu de données du deuxième cas les génotypes n'ayant été traités que par un des opérateurs sur les deux, soit 20 génotypes. Après cela la même méthode de filtrage que dans les deux cas précédents est conservée. La gamme des valeurs (Figure 26) est similaire aux deux premiers cas avec une densité allant de 42 à 231 stomates par mm<sup>2</sup>.

La Figure 27 présente le boxplot de la densité stomatique aréolaire selon l'opérateur. Même en retirant les génotypes qui auraient pu confondre l'effet opérateur et l'effet génotype, il semble rester un écart entre les deux opérateurs pour la mesure de la densité stomatique aréolaire.

Là encore, le meilleur modèle selon le critère du BIC est le modèle 2 (Tableau 7). Le modèle est également proche en termes de BIC du premier modèle sans opérateur dans le classement, le modèle 1. Les héritabilités du dispositif et individuelle sont similaires à celle du deuxième cas. La diminution de l'héritabilité individuelle est certainement due à la diminution de la variance génétique et ce à cause de l'élimination de 20 génotypes du jeu de données. L'héritabilité du dispositif reste quasiment la même que dans le cas précédent ce qui s'explique par l'absence de diminution du nombre de répétitions pour les génotypes restant. Sa légère baisse peut être imputée à la diminution de la variance génétique.

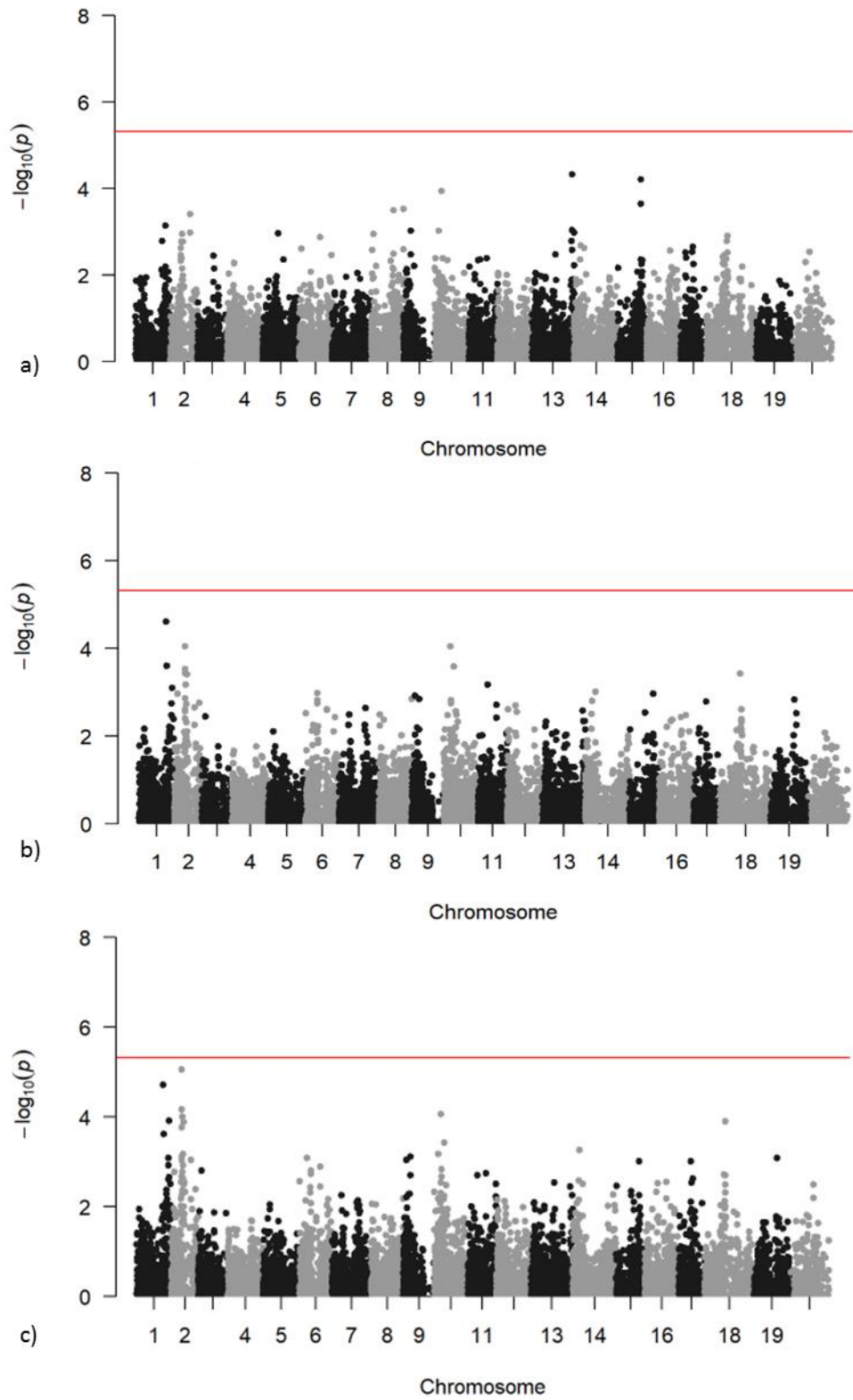


Figure 27 - Comparaison des Manhattan plots dans les 3 cas de gestion de données : a) cas 1 identique à la Figure 24 haut, b) cas 2 identique à la Figure 24 bas, c) cas 3.

La Figure 27 présente la comparaison des Manhattan plots des trois cas. La détection sur les chromosomes 1 et 2 est renforcée dans le troisième cas par rapport aux deux premiers. Cependant, il faut souligner que ce n'est plus la même population qui est utilisée puisque 20 génotypes ont été soustraits ce qui a changé les fréquences alléliques et peut donc participer à expliquer ce saut de détection. La corrélation entre les BLUPs communs au cas 1 (jeu de données complet) et au cas 3 est de 0,88, ce qui est rassurant. Le fait que la corrélation ne soit pas plus élevée peut sans doute s'expliquer par le fait que l'effet opérateur n'embarque plus d'effet génotypique avec lui, ce qui rend l'estimation des valeurs génotypiques différentes entre les deux cas. On peut même espérer que l'estimation des BLUPs soit meilleure dans le troisième cas pour la précédente raison. Cela pourrait aussi expliquer le saut de détection observé.



## 5 Discussion

La transpiration est un caractère déterminant dans l'amélioration variétale de la réponse à la sécheresse. Notamment, découpler la transpiration nocturne de la transpiration diurne permettrait d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau sans pénaliser la photosynthèse. L'anatomie stomatique est une composante forte de ce couplage. Dans cette étude d'association chez la vigne, nous espérons mettre en évidence l'architecture génétique de ces caractères anatomiques et faisons l'hypothèse d'un chevauchement partiel avec celui de la transpiration diurne et nocturne. Si notre étude a permis de faire progresser notre connaissance de ces caractères, elle n'a mis en évidence qu'un nombre limité d'associations significatives, et a rarement reflété les corrélations attendues. Nous discutons ci-après des raisons sous-jacentes.

### ***5.1 Confrontation des résultats avec les corrélations observées dans la littérature***

La corrélation positive lâche entre transpiration diurne et transpiration nocturne chez la vigne, décrite par Coupel-Ledru et al. (2016) se retrouve ici avec une corrélation de 0,20 significative. En revanche, la corrélation positive entre transpiration nocturne et densité stomatique, que les mêmes travaux avaient montré pour 5 géotypes issus d'un croisement Grenache x Syrah, ne se retrouve pas ici puisque la corrélation, très faible (0,1), n'est pas significative. Un résultat similaire est trouvé pour la transpiration diurne. Ces absences de corrélation n'incitent pas à penser qu'il existe une colocalisation d'associations pour la densité stomatique et la transpiration dans cette population, et les GWAS effectuées corroborent cette observation. Si cela se confirme, cela implique que la transpiration est essentiellement dépendante de l'ouverture des stomates (ou, moins probablement, de la perméabilité de la cuticule). Notons qu'en négligeant la transpiration cuticulaire, on pourrait estimer un indicateur de l'ouverture stomatique en divisant la transpiration par la densité stomatique. Une analyse génétique pourrait être effectuée pour ce caractère.

En général, l'ouverture stomatique (et donc la transpiration) varie positivement avec la taille des stomates (de Boer et al., 2016). Or ici, il n'y a pas de corrélation entre taille des stomates et transpiration diurne (Figure 9). De plus, la surface, longueur et largeur des stomates ont chacune une corrélation négative avec la transpiration nocturne, qui bien que faible est significative. Si l'essentiel de la transpiration nocturne est dû à une fermeture stomatique incomplète, ce résultat suggère que la taille de l'ostiole varie négativement avec la taille du complexe stomatique, ce qui n'est pas classiquement observé. Si l'essentiel de la transpiration nocturne est dû à une fermeture lente, ce résultat paraît contradictoire avec l'idée que les stomates de plus grande taille sont moins





réactifs que les plus petits, et ont tendance à se fermer plus lentement (Drake et al., 2013) ce qui entraîne une perte d'eau plus importante lors de la transition jour-nuit. Au bilan, cette corrélation négative, qui reste faible, est difficilement interprétable.

Le compromis taille des stomates – densité stomatique à l'échelle inter- et intra-spécifique (Hetherington and Woodward, 2003; Franks and Beerling, 2009b) n'a pas été observé dans notre étude : il n'y a pas de corrélation négative entre la surface (ou la longueur, ou la largeur) des stomates avec la densité stomatique. La variabilité observée dans notre population n'est peut-être pas suffisante pour pouvoir l'observer, car les références bibliographiques citées disposent d'une gamme allant de quasiment 0 à presque 1000 stomates par mm<sup>2</sup>. Dans notre étude, la densité stomatique aréolaire prend des valeurs entre 40 et 240 stomates par mm<sup>2</sup> ce qui correspond bien aux observations de Gómez-del-Campo et al. (2003) et à celles de Rogiers et al. (2009) pour la borne haute, mais pas du tout pour la borne basse puisque la leur est de 130 stomates par mm<sup>2</sup> et 160 stomates par mm<sup>2</sup>, respectivement. Cependant, le nombre de génotypes étudiés dans ces articles était bien plus restreint (seulement 4 et 10 génotypes contre 279 ici). Notre variabilité étant raisonnable, on peut suggérer que la domestication de la vigne a permis de débrider ce grand compromis.

Si nous livrons ici quelques clés d'interprétation, nous gardons aussi en tête que les résultats sont entachés d'un certain nombre de limites méthodologiques que nous développons ci-après.

## ***5.2 Difficultés liées à l'acquisition des données anatomiques à haut débit***

Un des objectifs de mon stage était de mettre au point une combinaison échantillonnage x acquisition d'images au microscope x outil d'analyse d'image permettant l'acquisition des données anatomiques avec un débit compatible avec la génétique d'association. Ainsi, pendant les quatre premiers mois du stage, j'ai testé de multiples protocoles en collaboration avec plusieurs interlocuteurs, avant d'opter pour une chaîne d'outils simples : empreintes au vernis (voire à la pâte dentaire), microscope optique manuel, segmentation des stomates et des cellules épidermiques à l'aide d'algorithmes classiques puis correction manuelle légère. Ce choix était motivé par le franc succès de ces algorithmes de segmentation sur mes images tests. Cependant, lors de l'expérimentation réelle, je n'ai pas réussi à reproduire des images d'une qualité suffisante pour le bon fonctionnement de ces algorithmes, notamment à cause de la villosité présente chez de nombreux cépages. J'ai donc été contrainte d'opérer la détection des stomates et des cellules épidermiques quasiment intégralement en mode manuel.

Cela a nécessité l'intervention de plusieurs opérateurs, selon un plan déséquilibré où tous les opérateurs n'ont pas traité tous les génotypes. Or, la mesure repose sur l'aptitude de l'opérateur à



discerner correctement les structures recherchées, ce qui peut donner des résultats fluctuants selon la qualité de l'image et la concentration de l'opérateur. Cela a induit des incertitudes sur la capacité des modèles statistiques à estimer correctement l'effet des opérateurs, bien que celui-ci semblât important. En effet, il y avait alors confusion entre l'effet de l'opérateur et celui du génotype. Cet écueil s'est répercuté jusque dans l'analyse génétique, puisque nous avons fait apparaître des associations, bien que toujours non significatives, lorsque nous avons limité les observations à celles collectées par les deux opérateurs principaux de manière équilibrée, mais réduisant ainsi le nombre de génotypes dans la population – ce qui est déconseillé en GWAS.

En dehors de l'effet opérateur, la détermination de la taille des structures est soumise à une limite liée à la prise d'images en elle-même. En effet, la surface d'une feuille n'est pas parfaitement plate, notamment au niveau des stomates et des nervures où on observe de fortes variations locales de la profondeur. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas mesuré de tailles de cellules épidermiques à partir de cellules adjacentes aux stomates. Par ailleurs, ces derniers n'appartenant pas tous au même plan, ils apparaissent généralement plus petits qu'en réalité. Ce problème a été contourné via la sélection systématique des stomates parmi les plus gros (voir Matériels et Méthodes) pour l'estimation de leur taille. Une autre option aurait été d'acquérir une pile d'images (z-stack) pour chaque lame avant de la soumettre à une projection visant à maximiser la netteté, mais ce système nécessite un microscope particulier et reste très chronophage.

Notons également que la détection des cellules épidermiques sous-jacentes aux nervures, de forme plus allongée, n'était pas toujours chose aisée sur les petites zones que nous caractérisions – ce qui n'est pas le cas lorsqu'on regarde la lame dans sa globalité car le patron de nervation apparaît alors clairement. Il est donc possible que des cellules épidermiques sous-jacentes aux nervures n'aient pas été correctement identifiées, ce qui affecterait en retour l'estimation des densités aréolaires (stomatique et épidermique), de l'indice stomatique aréolaire, et des paramètres de forme de cellule épidermique, notamment le ratio d'aspect qui traduit l'allongement des cellules. Il est donc possible que l'association significative détectée sur ce caractère, qui correspond à un allèle de fréquence mineure, soit le produit de la caractérisation erronée de cellules épidermiques sous-jacentes aux nervures sur certains génotypes. Cela demandera une vérification sur les images originales.

Enfin, une forte variation de la forme des cellules épidermiques a été observée à l'œil nu entre les échantillons, avec des cellules très lobées et d'autres très polygonales. Nous nous attendions à ce que la circularité des cellules épidermiques, que nous avons quantifiée, révèle au moins une association significative, ce qui n'était pas le cas. Il conviendra de vérifier sur les lames originales si le caractère lobé semble être attribué à un effet génotype, ou s'il y a beaucoup de variation sur un même échantillon.



### **5.3 Une sous-exploitation des valeurs de transpiration**

Les données de transpiration utilisées pour les analyses ont été générées rapidement par Adrianus Westgeest pour les besoins de ce rapport, mais un certain nombre d'étapes restent à optimiser avant une détection plus efficace des associations. D'une part, chaque feuille a été caractérisée sur une cinétique d'environ 24 h avec une résolution temporelle de 30 min, alors que les données dont j'ai bénéficié étaient restreintes à une valeur diurne et une valeur nocturne, intégrées sur la période en question. L'analyse approfondie de ces cinétiques permettra non seulement de faciliter l'identification des valeurs aberrantes mais aussi d'acquérir des variables supplémentaires liées à la dynamique des stomates (rapidité d'ouverture/fermeture, réouverture nocturne par exemple).

D'autre part, les variations spatiales et temporelles du microenvironnement (qui jouent sur la transpiration indépendamment des stomates, et modifient le comportement des stomates) n'ont pas été prises en compte. Ainsi, le déficit de pression de vapeur (VPD) a pu varier d'une journée de mesure à l'autre, engendrant des différences de transpiration quasi proportionnelles. De même, le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) varie dans la chambre, aussi les valeurs de transpiration pourraient-elles être corrigées selon la position dont elles sont issues, à l'aide d'une cartographie fine du PAR. Une autre stratégie serait d'introduire, dans le modèle d'extraction des BLUPs, un effet de la position, sans a priori, ce qui pourrait permettre de prendre en compte d'autres gradients spatiaux suspectés (température, humidité relative) – à supposer que ces derniers soient constants d'un jour à l'autre, ce qui est moins évident que pour le PAR.

### **5.4 Des facteurs environnementaux et développementaux parfois mal contrôlés**

Au-delà des conditions climatiques au moment de la mesure de la transpiration, l'environnement a également varié drastiquement au cours de la campagne de prélèvement, malgré le soin apporté à la conduite des plantes et le choix ciblé de la période d'expérimentation. En effet, les plantes ont subi l'épisode de canicule extrême du 28/06/2019, à savoir au moment où nous avons collecté environ un tiers des échantillons. La vague de chaleur ayant préférentiellement touchée la face ouest du couvert sur laquelle nous effectuons nos prélèvements, nous avons dû nous résoudre à passer à la face est, et donc à introduire un nouveau facteur dans le modèle. Cependant, il est difficile d'estimer si cet effet est le même chez tous les génotypes. Biologiquement, on a même des raisons de penser l'inverse : par exemple, le développement stomatique est sensible au rayonnement (qui varie selon la face), mais peut-être pas de manière identique chez tous les génotypes. De plus, prélever côté est le matin présente l'inconvénient que les feuilles sont plus exposées au rayonnement au moment du prélèvement, ce qui les rend plus vulnérables à la cavitation lorsqu'on les détache de la plante. Or la cavitation affecte plus particulièrement certains génotypes sensibles à



ce phénomène. Notons toutefois que notre équipe a mis à profit cet épisode de canicule en effectuant des notations de sévérité des symptômes dans la population. Des analyses effectuées par Aude Coupel-Ledru ont permis de détecter une association significative pour ce caractère.

Une variabilité développementale mal contrôlée pourrait également affecter nos observations. Les feuilles récoltées, essentiellement dans le tiers médian de la canopée, devaient normalement être matures ce qui permet d'accéder aux valeurs finales des caractéristiques anatomiques mesurées. Le choix des feuilles était fait à l'œil et sous la contrainte des feuilles saines disponibles, en particulier après l'épisode de canicule. Ainsi, il n'est pas impossible que des feuilles avec des caractéristiques anatomiques non fixées se soient glissées parmi les échantillons. Par exemple, collecter des feuilles n'ayant pas fini leur croissance aurait tendance à augmenter artificiellement la densité stomatique, car la fin de la production des stomates précède largement la fin de l'expansion des cellules épidermiques (facteur de dilution de la densité stomatique). Une analyse plus complète de la taille des feuilles récoltées, ainsi que l'examen des valeurs de SPAD (qui traduit la teneur en chlorophylle et est donc un indicateur de la maturité physiologique de la feuille), aideront à clarifier ce point de manière quantitative.

## ***5.5 Une analyse génétique à perfectionner***

Le seuil de détection utilisé, Bonferroni, est très strict ce qui peut expliquer en partie pourquoi seulement une association a été détectée toutes variables confondues. Toutefois, les SNPs qui s'approchent du seuil peuvent être considérés pour pousser l'analyse plus loin en accédant aux annotations des gènes à proximité de ces marqueurs. Ce travail n'a pas pu être réalisé dans le cadre de ce rapport.

Seules cinq variables anatomiques sur les treize mesurées sont présentées ici en détails. Etudier les corrélations entre et avec les variables restantes ainsi que leur GWAS est une des suites logiques. La question de l'opérateur et du traitement du jeu de données reste irrésolue et ne se pose pas seulement pour la densité stomatique aréolaire. Etant donné la bonne corrélation et le fait qu'on discerne les pics sur les chromosomes 1 et 2, ces deux régions semblent fiables. Mais la disparition des pics sur les chromosomes 13 et 15 pose question. En éliminant 20 génotypes de la population les fréquences alléliques de certains SNPs ont pu être fortement modifiées ce qui change la possibilité de détecter certains SNPs dans la population réduite. Ne pas voir ces SNPs dans la population réduite ne veut pas pour autant dire qu'ils marquent une zone du génome inutile à la détermination du caractère considéré. Cependant, réduire la population reste discutable puisque cette dernière a été développée spécifiquement pour ce type de recherches. Enfin, la disponibilité prochaine d'environ 50k nouveaux marqueurs (GBS) devrait contribuer à améliorer fortement la détection d'associations significatives.





## Conclusion

Pour cette étude, une méthode d'analyse d'images permettant de mesurer 13 variables anatomiques foliaires a été développée. Cette méthode reste largement manuelle à cause de la difficulté à produire des images facilement exploitables dans cette population. Un pipeline de phénotypage permettant d'optimiser l'enchaînement des différents types de mesure a été mis en place avec succès, et plusieurs dizaines de milliers de données phénotypiques ont été générées. Le temps consacré au phénotypage a laissé peu de temps aux analyses ce qui n'a pas permis de les approfondir et de les raffiner. Cependant, bien que seule une association significative ait été trouvée, et ce pour le caractère ratio d'aspect, les autres variables (la densité stomatique aréolaire, la longueur et la largeur des stomates, la surface des stomates et les trois variables de transpiration) montrent toutes des associations qui s'approchent du seuil de significativité. S'intéresser aux annotations des gènes proches des marqueurs correspondant pourra permettre d'avancer sur la question du déterminisme génétique de ces caractères. Améliorer la prise en compte de l'effet de l'opérateur en imagerie, même si cette question n'est pas résolue pour le moment, participera aussi à rendre l'analyse génétique plus solide. La corrélation attendue entre la densité stomatique et la transpiration (diurne ou nocturne), ou celle entre densité et taille stomatique, n'ont pas été observées, mais il faut garder en tête qu'une exploration plus approfondie des données de transpiration permettront peut-être de réviser les présentes conclusions.



## Références bibliographiques

- Allwright MR, Payne A, Emiliani G, Milner S, Viger M, Rouse F, Keurentjes JJB, Bérard A, Wildhagen H, Faivre-Rampant P, et al** (2016) Biomass traits and candidate genes for bioenergy revealed through association genetics in coppiced European *Populus nigra* (L.). *Biotechnol Biofuels* **9**: 195
- Bacon M** (2004) *Water Use Efficiency in Plant Biology*. John Wiley & Sons
- Bergmann DC, Sack FD** (2007) Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 163–181
- de Boer HJ, Price CA, Wagner-Cremer F, Dekker SC, Franks PJ, Veneklaas EJ** (2016) Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. *New Phytol* **210**: 1219–1228
- Büßis D, von Groll U, Fisahn J, Altmann T** (2006) Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Funct Plant Biol* **33**: 1037
- Caine RS, Yin X, Sloan J, Harrison EL, Mohammed U, Fulton T, Biswal AK, Dionora J, Chater CC, Coe RA, et al** (2019) Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytol* **221**: 371–384
- Caird MA, Richards JH, Donovan LA** (2007) Nighttime Stomatal Conductance and Transpiration in C3 and C4 Plants. *New Phytol* **143**: 7
- Chaves MM, Santos TP, Souza CR, Ortuño MF, Rodrigues ML, Lopes CM, Maroco JP, Pereira JS** (2007) Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Ann Appl Biol* **150**: 237–252
- Chhetri HB, Macaya-Sanz D, Kainer D, Biswal AK, Evans LM, Chen J, Collins C, Hunt K, Mohanty SS, Rosenstiel T, et al** (2019) Multitrait genome-wide association analysis of *Populus trichocarpa* identifies key polymorphisms controlling morphological and physiological traits. *New Phytol* **nph.15777**
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD** (2004) Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot* **55**: 2447–2460
- Costa JM, Monnet F, Jannaud D, Leonhardt N, Ksas B, Reiter IM, Pantin F, Genty B** (2015) *OPEN ALL NIGHT LONG*: The dark side of stomatal control. *Plant Physiol* **167**: 289–294
- Coupel-Ledru A, Lebon E, Christophe A, Gallo A, Gago P, Pantin F, Doligez A, Simonneau T** (2016) Reduced nighttime transpiration is a relevant breeding target for high water-use efficiency in grapevine. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 8963–8968
- Dittberner H, Korte A, Mettler-Altmann T, Weber APM, Monroe G, de Meaux J** (2018) Natural variation in stomata size contributes to the local adaptation of water-use efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Ecol* **27**: 4052–4065
- Doheny-Adams T, Hunt L, Franks PJ, Beerling DJ, Gray JE** (2012) Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **367**: 547–555



- Douthe C, Medrano H, Tortosa I, Escalona JM, Hernández-Montes E, Pou A** (2018) Whole-Plant Water Use in Field Grown Grapevine: Seasonal and Environmental Effects on Water and Carbon Balance. *Front Plant Sci* **9**: 1540
- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC** (2014) The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **201**: 1205–1217
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ** (2013) Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot* **64**: 495–505
- Dunn J, Hunt L, Afsharinafar M, Meselmani MA, Mitchell A, Howells R, Wallington E, Fleming AJ, Gray JE** (2019) Reduced stomatal density in bread wheat leads to increased water-use efficiency. *J Exp Bot* **60**: 248
- Eisenach C, Chen Z-H, Grefen C, Blatt MR** (2012) The trafficking protein SYP121 of *Arabidopsis* connects programmed stomatal closure and K<sup>+</sup> channel activity with vegetative growth: SYP121 and stomatal opening. *Plant J* **69**: 241–251
- Faralli M, Matthews J, Lawson T** (2019) Exploiting natural variation and genetic manipulation of stomatal conductance for crop improvement. *Curr Opin Plant Biol* **49**: 1–7
- Flexas J, Galma S J, Galla A, Gula As J, Pou A, Ribas-Carbo M, Tomã S M, Medrano H** (2010) Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. *Aust J Grape Wine Res* **16**: 106–121
- Fox S, Southam P, Pantin F, Kennaway R, Robinson S, Castorina G, Sánchez-Corrales YE, Sablowski R, Chan J, Grieneisen V, et al** (2018) Spatiotemporal coordination of cell division and growth during organ morphogenesis. *PLOS Biol* **16**: e2005952
- Fraga H, García de Cortázar Atauri I, Malheiro AC, Santos JA** (2016) Modelling climate change impacts on viticultural yield, phenology and stress conditions in Europe. *Glob Change Biol* **22**: 3774–3788
- Franks PJ, Beerling DJ** (2009a) Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 10343–10347
- Franks PJ, Beerling DJ** (2009b) CO<sub>2</sub>-forced evolution of plant gas exchange capacity and water-use efficiency over the Phanerozoic. *Geobiology* **7**: 227–236
- Franks PJ, Casson S** (2014) Connecting stomatal development and physiology. *New Phytol* **201**: 1079–1082
- Franks PJ, Farquhar GD** (2007) The Mechanical Diversity of Stomata and Its Significance in Gas-Exchange Control. *Plant Physiol* **143**: 78–87
- Franks PJ, Leitch IJ, Ruzsala EM, Hetherington AM, Beerling DJ** (2012) Physiological framework for adaptation of stomata to CO<sub>2</sub> from glacial to future concentrations. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **367**: 537–546
- Franks PJ, W. Doheny-Adams T, Britton-Harper ZJ, Gray JE** (2015) Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytol* **207**: 188–195



- Gago P, Conejero G, Martínez MC, This P, Verdeil JL** (2019) Comparative Anatomy and Morphology of the Leaves of Grenache Noir and Syrah Grapevine Cultivars. *South Afr J Enol Vitic.* doi: 10.21548/40-2-3031
- Gibberd MR, Walker RR, Blackmore DH, Condon AG** (2001) Transpiration efficiency and carbon-isotope discrimination of grapevines grown under well-watered conditions in either glasshouse or vineyard. *Aust J Grape Wine Res* **7**: 110–117
- Gómez-del-Campo M, Ruiz C, Baeza P, Lissarrague JR** (2003) Drought adaptation strategies of four grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.): modification of the properties of the leaf area. *OENO One* **37**: 131
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux J-J, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, et al** (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* **169**: 623–635
- Han S-K, Torii KU** (2016) Lineage-specific stem cells, signals and asymmetries during stomatal development. *Development* **143**: 1259–1270
- Hepworth C, Doheny-Adams T, Hunt L, Cameron DD, Gray JE** (2015) Manipulating stomatal density enhances drought tolerance without deleterious effect on nutrient uptake. *New Phytol* **208**: 336–341
- Hetherington AM, Woodward FI** (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**: 901–908
- Homann U, Thiel G** (2002) The number of K(+) channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10215–10220
- Hughes J, Hepworth C, Dutton C, Dunn JA, Hunt L, Stephens J, Waugh R, Cameron DD, Gray JE** (2017) Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield. *Plant Physiol* **174**: 776–787
- IPCC**, (2015) Climate change 2014: synthesis report. Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland
- Jezek M, Blatt MR** (2017) The membrane transport system of the guard cell and its integration for stomatal dynamics. *Plant Physiol* **174**: 487–519
- Jones H** (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J Exp Bot* **49**: 387–398
- Lawson T, Blatt MR** (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *PLANT Physiol* **164**: 1556–1570
- Lehmann P, Or D** (2015) Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytol* **207**: 1015–1025
- McElwain JC, Yiotis C, Lawson T** (2016) Using modern plant trait relationships between observed and theoretical maximum stomatal conductance and vein density to examine patterns of plant macroevolution. *New Phytol* **209**: 94–103





- McKown AD, Guy RD, Quamme L, Klápště J, La Mantia J, Constabel CP, El-Kassaby YA, Hamelin RC, Zifkin M, Azam MS** (2014) Association genetics, geography and ecophysiology link stomatal patterning in *Populus trichocarpa* with carbon gain and disease resistance trade-offs. *Mol Ecol* **23**: 5771–5790
- McKown AD, Klápště J, Guy RD, Corea ORA, Fritsche S, Ehling J, El-Kassaby YA, Mansfield SD** (2019) A role for *SPEECHLESS* in the integration of leaf stomatal patterning with the growth vs disease trade-off in poplar. *New Phytol* **nph.15911**
- Medrano H, Tomás M, Martorell S, Flexas J, Hernández E, Rosselló J, Pou A, Escalona J-M, Bota J** (2015) From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. *Crop J* **3**: 220–228
- Moriondo M, Jones GV, Bois B, Dibari C, Ferrise R, Trombi G, Bindi M** (2013) Projected shifts of wine regions in response to climate change. *Clim Change* **119**: 825–839
- Nicolas SD, Péros J-P, Lacombe T, Launay A, Le Paslier M-C, Bérard A, Mangin B, Valière S, Martins F, Le Cunff L, et al** (2016) Genetic diversity, linkage disequilibrium and power of a large grapevine (*Vitis vinifera* L) diversity panel newly designed for association studies. *BMC Plant Biol.* doi: 10.1186/s12870-016-0754-z
- Papanatsiou M, Amtmann A, Blatt MR** (2016) Stomatal Spacing Safeguards Stomatal Dynamics by Facilitating Guard Cell Ion Transport Independent of the Epidermal Solute Reservoir. *Plant Physiol* **172**: 254–263
- Papanatsiou M, Amtmann A, Blatt MR** (2017) Stomatal clustering in *Begonia* associates with the kinetics of leaf gaseous exchange and influences water use efficiency. *J Exp Bot* **68**: 2309–2315
- Papanatsiou M, Petersen J, Henderson L, Wang Y, Christie JM, Blatt MR** (2019) Optogenetic manipulation of stomatal kinetics improves carbon assimilation, water use, and growth. *Science.* doi: 10.1126/science.aaw0046
- Parlange J-Y, Waggoner PE** (1970) Stomatal Dimensions and Resistance to Diffusion. *Plant Physiol* **46**: 337–342
- Pillitteri LJ, Torii KU** (2012) Mechanisms of Stomatal Development. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 591–614
- Rebetzke GJ, Richards R, Condon AG, van Herwaarden AF** (2002) Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Curr Biol* **7**: R126
- Rogiers SY, Greer DH, Hutton RJ, Landsberg JJ** (2009) Does night-time transpiration contribute to anisohydric behaviour in a *Vitis vinifera* cultivar? *J Exp Bot* **60**: 3751–3763
- Schultz HR** (2003) Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell Environ* **26**: 1393–1405
- Shope JC, DeWald DB, Mott KA** (2003) Changes in Surface Area of Intact Guard Cells Are Correlated with Membrane Internalization. *PLANT Physiol* **133**: 1314–1321
- Simonneau T, Ollat N, Pellegrino A, Lebon E** (2014) Contrôle de l'état hydrique dans la plante et réponses physiologiques de la vigne à la contrainte hydrique. *Innov Agron* **38**: 13–32

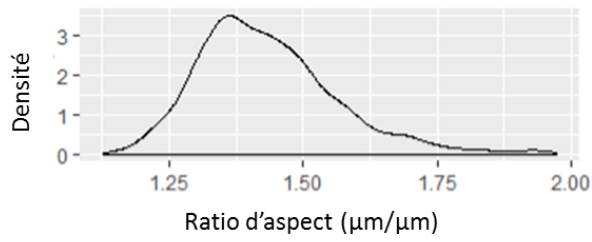
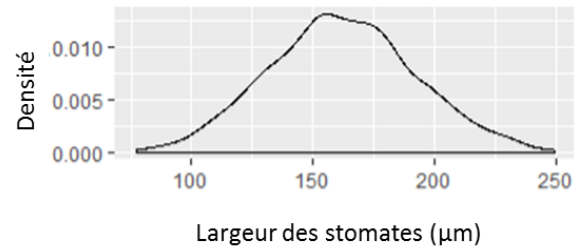
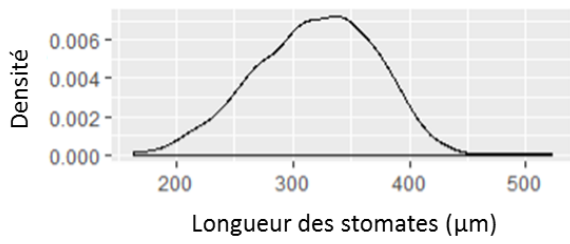
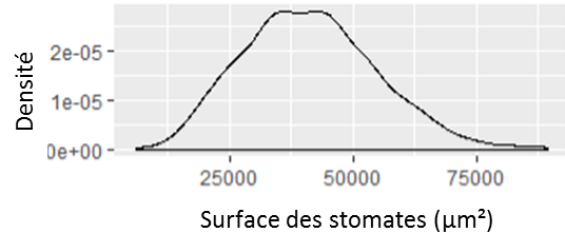
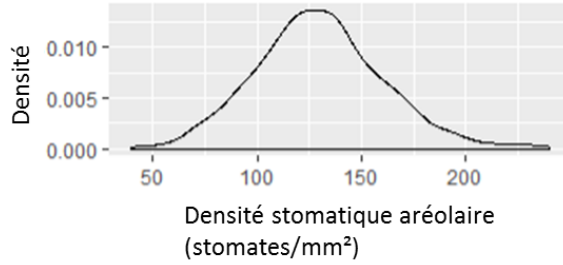


- Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Hara-Nishimura I** (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*. *New Phytol* **198**: 757–764
- Tomás M, Medrano H, Escalona JM, Martorell S, Pou A, Ribas-Carbó M, Flexas J** (2014) Variability of water use efficiency in grapevines. *Environ Exp Bot* **103**: 148–157
- Tomás M, Medrano H, Pou A, Escalona JM, Martorell S, Ribas-Carbó M, Flexas J** (2012) Water-use efficiency in grapevine cultivars grown under controlled conditions: effects of water stress at the leaf and whole-plant level: Genotypic variability of water-use efficiency. *Aust J Grape Wine Res* **18**: 164–172
- Torii KU** (2015) Stomatal differentiation: the beginning and the end. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 16–22
- Wolkovich EM, García de Cortázar-Atauri I, Morales-Castilla I, Nicholas KA, Lacombe T** (2018) From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nat Clim Change* **8**: 29–37
- Yates SA, Bruun A, Hodel M, Grieder C, Hund A, Walter A, Studer B** (2018) Genetic determination of stomatal patterning in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). doi: 10.1101/490029
- Yoo CY, Pence HE, Jin JB, Miura K, Gosney MJ, Hasegawa PM, Mickelbart MV** (2010) The *Arabidopsis* GTL1 Transcription Factor Regulates Water Use Efficiency and Drought Tolerance by Modulating Stomatal Density via Transrepression of *SDD1*. *Plant Cell* **22**: 4128–4141



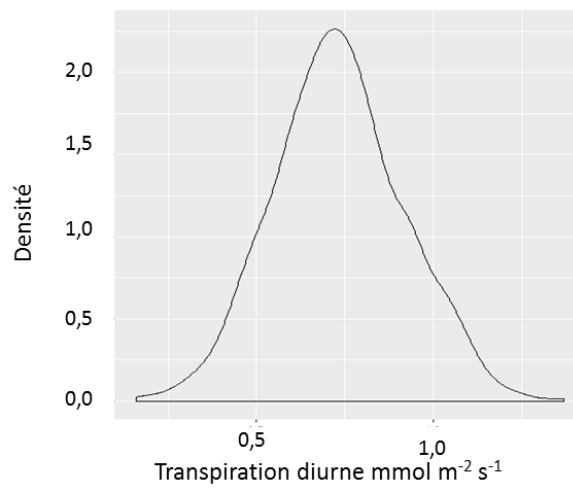
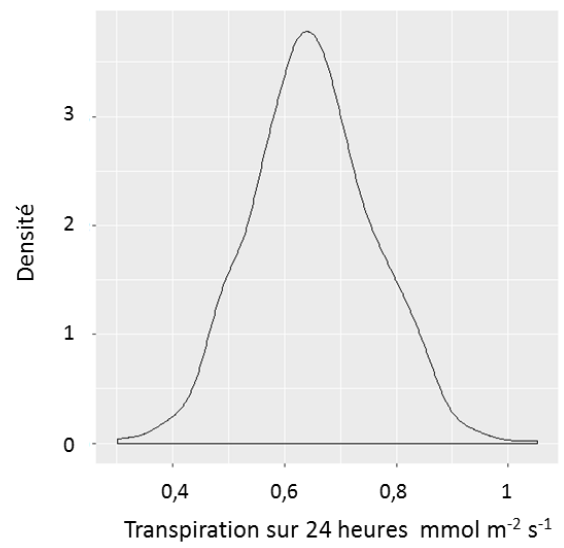
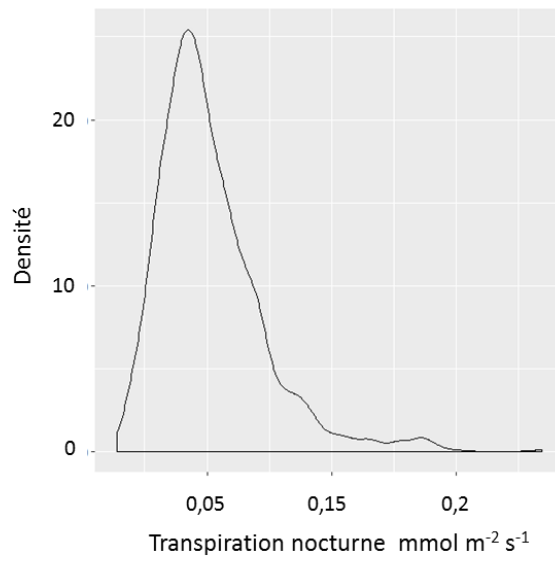
## Annexes

# Annexe 1 Distribution des 5 variables anatomiques





## Annexe 2 Distribution des trois variables de transpiration





## Travail réalisé au cours du stage

Au cours du stage j'ai mis au point le protocole pour les empreintes épidermiques ce qui a nécessité des visites au CIRAD. J'ai bénéficié de l'aide Christelle Baptiste pour démarrer les tests de protocoles d'empreinte. J'ai également bénéficié de son assistance, de celle de Jean-Luc Verdeil (PHIV) et de Carine Alcon (BPMP) pour les tests d'outils d'acquisition d'images. J'ai choisi la méthode d'acquisition des images la plus adaptée en termes de qualité d'image et de débit nécessaire pour l'étude. J'ai réalisé une macro ImageJ pour le phénotypage sur la base d'un script de base fourni par Marc Lartaud (PHIV) que j'ai beaucoup transformé : cette macro combine des phases de détection automatique et manuelle. Cette macro générant beaucoup de données brutes et non mises en forme, j'ai également écrit deux scripts R pour l'extraction et la mise en forme de ces données. J'ai ensuite écrit pour chaque variable un script R permettant de visualiser les données, d'éliminer les valeurs aberrantes, de récupérer les données filtrées et d'extraire les BLUPs ainsi que les héritabilités. J'ai fait tourner le script R pour la GWAS avec quelques modifications minimales mais je ne l'ai pas écrit. Ce script GWAS a été écrit par Timothée Flutre (DAAV) puis modifié par Aude Coupel-Ledru, post-doc en visite au LEPSE pour l'expérimentation qu'elle avait en commun avec Adriaan et moi. La moitié du phénotypage en imagerie a été prise en charge par une autre personne du laboratoire, Gaëlle Rolland. Je me suis occupée des trois-quarts de ce qui restait. La récolte des feuilles sur la pépinière était assurée quotidiennement par une équipe de trois ou quatre personnes (si possible) dans laquelle j'étais systématiquement présente, de même pour l'installation dans l'automate de phénotypage et pour les empreintes épidermiques. La gestion de l'automate de phénotypage était assurée par Aude Coupel-Ledru et Adriaan Westgeest. Les données de transpiration ont été récoltées par Adriaan Westgeest qui leur a appliqué un préfiltrage des valeurs aberrantes avant de me les fournir.

## Résumé

La viticulture est fortement affectée par le changement climatique, notamment par des épisodes de sécheresse plus fréquents et extrêmes. Une stratégie d'adaptation est la sélection de variétés avec une meilleure efficacité d'utilisation d'eau (WUE). Récemment il a été montré que la WUE est améliorée en diminuant les pertes en eau pendant la nuit (transpiration nocturne) et qu'il existe de la variation génétique pour ce caractère chez la vigne. Les stomates contrôlent la transpiration par leur niveau de fermeture et par leur nombre, mais la contribution de chacun de ces caractères à la transpiration nocturne est inconnue. L'objectif de cette étude, réalisée grâce au soutien financier du GIS Fruits, est de caractériser la contribution des caractéristiques anatomiques foliaires, comme la densité stomatique (nombre de stomate par unité de surface foliaire) et la taille des stomates par exemple, sur la transpiration diurne et nocturne, et de rechercher les déterminismes génétiques de ces caractères anatomiques. Pour cette étude, une méthode d'analyse d'image a été développée pour mesurer treize variables anatomiques foliaires dans un panel d'association de 279 cépages. De manière surprenante, une faible corrélation positive a été trouvée entre la densité stomatique et la transpiration diurne mais pas pour la transpiration nocturne. De plus, nous n'avons pas retrouvé la corrélation négative attendue entre la densité stomatique et la taille des stomates. Sur cinq des variables anatomiques foliaires, aucune association significative n'a été trouvée exceptée pour une variable caractérisant l'aspect allongé des cellules épidermiques. Cependant, l'effet de l'opérateur d'analyse d'images était une source de variation significative causant du bruit dans les analyses génétiques, laissant entrevoir la possibilité de découvrir des associations à l'aide d'une exploration plus approfondie. Un regard critique est proposé sur les résultats et les méthodes, et des améliorations sont suggérées.

### Mots clés

[Vigne, densité stomatique, anatomie des stomates, transpiration, génétique d'association]

Pour citer ce document : [Roux, Lucille, 2019. Contribution de la densité stomatique à la transpiration chez la vigne : approche par génétique d'association. Mémoire d'Ingénieur Agronome, option Amélioration des plantes et ingénierie méditerranéenne et tropicale, Montpellier SupAgro.100 pages.]

Montpellier SupAgro, Institut national d'études supérieures agronomiques de Montpellier, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02. <http://www.supagro.fr>