



Master "Biologie Végétale" co-acrédité :  
Université d'Angers, Nantes Université et  
l'Institut Agro Rennes-Angers

Centre INRAE du Rheu – UMR IGEPP

## RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

**Jonas PETARD**

Au laboratoire INRAE de l'IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes) au sein de l'équipe RCA (Rendement sous Contraintes Abiotiques)

en vue de l'obtention du

# **Master Biologie Végétale Parcours : Gestion de la Santé des Plantes (GSP)**

(Responsable de stage : Florence VAL, enseignante-chercheuse et Maverick GOUEROU,  
Doctorant)

Sujet :

**ÉTUDE DE L'EFFET D'UN DÉFICIT HYDRIQUE SUR LES RÉPONSES  
MOLÉCULAIRES DE *S. TUBEROSUM***

Soutenance devant le jury d'examen le 09/06/23





Master "Biologie Végétale" co-acrédité :  
Université d'Angers, Nantes Université et  
l'Institut Agro Rennes-Angers

Centre INRAE du Rhei – UMR IGEPP

## RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

**Jonas PETARD**

Au laboratoire INRAE de l'IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes) au sein de l'équipe RCA (Rendement sous Contraintes Abiotiques)

en vue de l'obtention du

# Master Biologie Végétale Parcours : Gestion de la Santé des Plantes (GSP)

(Responsable de stage : Florence VAL, enseignante-chercheuse et Maverick GOUEROU,  
Doctorant)

Sujet :

ÉTUDE DE L'EFFET D'UN DÉFICIT HYDRIQUE SUR LES RÉPONSES  
MOLÉCULAIRES DE *S. TUBEROSUM*

Soutenance devant le jury d'examen le 09/06/23



**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) Jonas PETARD, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.



<http://dune.univ-angers.fr>

#### § PARTIE RESERVEE A L'ETUDIANT(E)

Courriel: *jonas.petard@protonmail.fr* N° étudiant : *22008931*

Je soussigné(e) (nom prénom) *PETARD Jonas*

certifie être l'auteur du document intitulé *Étude de l'effet d'un déficit hydrique sur les réponses moléculaires de Solanum tuberosum*  
préparé sous la direction de *Tlorena Val*

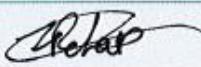
et soutenu le *09/06/2023*

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury et certifie disposer de tous les droits sur les documents figurant dans mon mémoire ou, à défaut, disposer de toutes les autorisations nécessaires auprès des ayants droits. Agissant en l'absence de toute contrainte et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux :

J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

accès tout public à compter :  de la date de soutenance  
 accès réservé communauté universitaire  du

Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : *01/06/2023* À : *Rennes* Signature : 

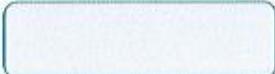
#### § PARTIE RESERVEE AU (A LA) MAITRE DE STAGE

Nom du (de la) maître de stage :

J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

accès tout public à compter :  de la date de soutenance  
 accès réservé communauté universitaire  du

Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : ..... À : ..... Signature : 

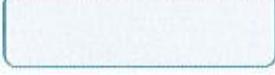
#### § PARTIE RESERVEE AUX MEMBRES DU JURY

Nom(s) :

Autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

sans corrections  accès tout public à compter :  de la date de soutenance  
 avec corrections  réservé communauté universitaire  du

N'autorise pas la diffusion du document.

Le : ..... À : ..... Signature(s) : 



## **Remerciements**

Je tiens à remercier l'équipe RCA de l'IGEPP et l'UP ESP de l'institut Agro de Rennes pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes respectives.

Merci à tous les stagiaires, doctorants et jeunes contractuels pour les échanges, les moments passés ensemble sur les temps de pause et notamment le midi. Plus particulièrement, je remercie mes anciennes camarades de M1 Anne-Solenn et Julie pour leur soutien moral infaillible.

Je tiens particulièrement à remercier Cécile BARON de s'être greffée à mon stage et de m'avoir encadré, formé sur la qPCR et les pratiques en laboratoire. Sans elle mon stage aurait été bien différent.

Je remercie également mes encadrants Florence Val et Maverick GOUEROU pour leur confiance et leur aide pour mener à bien ce stage. Merci à eux pour leurs discussions enrichissantes, leurs relectures et leurs corrections.



# Table des matières

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	- 13 -
<b>1. Introduction bibliographique.....</b>	- 17 -
<b>1.1. Contexte socio-économique.....</b>	- 17 -
<b>1.2. Contexte scientifique .....</b>	- 19 -
<b>1.2.1. Culture de la pomme de terre.....</b>	- 19 -
<b>1.2.2. Perception et signalisation .....</b>	- 19 -
<b>1.3. Contexte du stage et objectifs .....</b>	- 27 -
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	- 29 -
<b>2.1. Matériel végétal et dispositif expérimental .....</b>	- 29 -
<b>2.1.1. Dispositif pour l'évaluation du stress hydrique .....</b>	- 29 -
<b>2.1.2. Prélèvements .....</b>	- 31 -
<b>2.2. Extraction d'ADN et électrophorèse.....</b>	- 33 -
<b>2.3. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc .....</b>	- 33 -
<b>2.4. qPCR.....</b>	- 37 -
<b>3. Résultats .....</b>	- 41 -
<b>3.1. Optimisation de qPCR .....</b>	- 41 -
<b>3.2. Analyse par Composante Principale.....</b>	- 41 -
<b>3.3. Expression relative .....</b>	- 43 -
<b>4. Discussion .....</b>	- 49 -
<b>5. Conclusion.....</b>	- 55 -
<b>6. Perspectives.....</b>	- 57 -
<b>REFERENCES .....</b>	- 59 -
<b>ANNEXES.....</b>	- 66 -



## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

### **A**

**AAO** : *Abscisic-Aldehyde Oxidase* (aldéhyde-abscissique oxydase)

**ABA** : Acide Abscissique

**ABF** : *ABA Binding Factor* (facteur de liaison à l'ABA)

**ABI** : *ABA insensitive 1* (insensible à l'ABA 1)

**ABRE** : ABA Response Element (élément de réponse à l'ABA)

**AREB** : ABRE Binding Protein (Protéine de liaison à ABRE)

### **B**

**BAM** : *Barely Any Meristem* (presque tout méristème)

### **C**

**CHS** : *Chalcone Synthase* (Chalcone synthétase)

**CLE25** : *Clavata 3/embryo-surrounding region-related 25*

**CPK6** : *Calcium Dependant Kinase 6* (kinase dépendante du calcium 6)

**Ct** : *Cycle threshold* (Cycle seuil)

### **D**

**DHN** : Déhydrine

**DREB2** : *Drought Responsive Element Binding 2* (élément de liaison répondant à la sécheresse)

### **G**

**GHR1** : *Guard Cell Hydrogen Peroxyde-Resistant 1* (cellule de garde résistante au peroxyde d'hydrogène 1)

### **H**

**HAI** : *Highly Aba-Induced Gene* (gene hautement induit par l'ABA)

**HSP100** : *Heat-Shock Protein 100* (protein de choc thermique 100)

### **I**

**IS** : IMPOTSTRESS

### **J**

**JAE** : Jours Après Émergence

### **L**

**LEA** : *Late Embryogenesis Abundant* (embryogénèse tardive abondant)

## M

**MDA** : malondialdéhyde

## N

**NCED3** : *9-Cis-Epoxy carotenoid Dioxygenase 3*

## P

**PAL** : Phénylalanine Amonia Lyase

**PEG** : poly-éthylène glycol

**PP2C** : *type 2C Phosphatase Protein* (protéine phosphatase de type 2C)

**PYL** : PYR-Like (semblable à PYR)

**PYR** : Pyrabactin resistance 1

## R

**RAB** : *Responsive to ABA* (répond à l'ABA)

**RBOH** : *Respiratory Burst Oxidase Homologs* (homologue de l'oxydase du burst respiratoire)

**RCAR** : *Regulatory Component of ABA Receptor* (composant régulateur du récepteur à l'ABA)

**RCP** : *Representative Concentration Pathway*, (trajectoires représentatives de concentration)

**RD** : *Responsive to Drought* (répond à la sécheresse)

**RLK** : *Receptor-Like Kinase* (kinase semblable à un récepteur)

**ROS** : *Reactive Oxygen Species* (espèces réactives de l'oxygène)

## S

**SDR** : Small Deshydrogenase/Reductase (petite Déshydrogénase/Réductase)

**SOD** : Super Oxyde Dismutase

**SnRK** : *Sucrose non fermenting Related protein Kinase* (protéine kinase reliée à la non fermentation du saccharose)

**SUSY** : *Sucrose Synthase* (Sucrose Synthétase)

## T

**TOR** : *Target Of Rifampicine* (cible de la rifampicine)

## W

**WUE** : *Water Use Efficiency* (efficience de l'usage de l'eau)

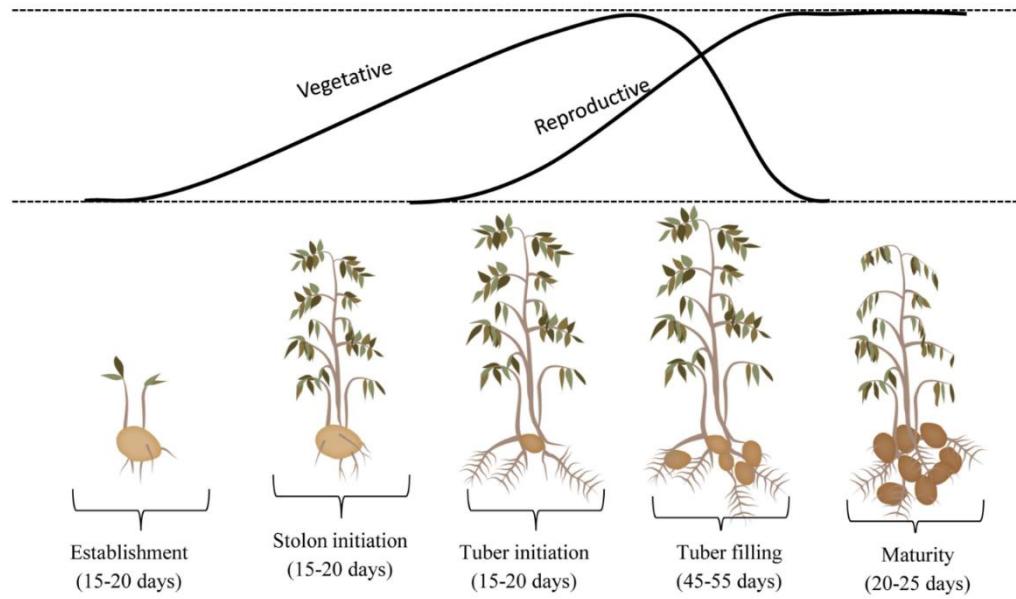




## **1. Introduction bibliographique**

### **1.1. Contexte socio-économique**

La pomme de terre *Solanum tuberosum* L. est la quatrième culture vivrière la plus importante avec une production de 376 millions de tonnes (Mt) en 2021, après le maïs (1 210 Mt), le riz (787 Mt) et le blé (770 Mt) (FAOSTAT, 2022). La production de pommes de terre a augmenté de près de 40 % entre 1961 et 2021. La Chine est le premier producteur mondial de pomme de terre avec 94 Mt produites en 2021 soit le quart de la production mondiale de pomme de terre, devant l'Inde (54 Mt) et l'Ukraine (21 Mt). La France est le 8<sup>ème</sup> producteur mondial de pommes de terre avec près de 9 Mt produites en 2021. La pomme de terre présente différents usages et il est estimé que moins de la moitié des pommes de terre produites dans le monde sont consommées fraîches (CIP). La pomme de terre est aussi transformée en produits alimentaires et pour nourrir du bétail, utilisée pour son amidon dans différentes industries (*e.g.* textile, papier, adhésif, agent texturant, éthanol). Des plants de pomme de terre sont également cultivés pour la production de tubercules de semence. Cette culture joue un rôle important dans la sécurité alimentaire notamment dans les systèmes agricoles reposant sur la pomme de terre, particulièrement dans les régions pauvres d'Asie et d'Afrique comme en Asie du Sud ou au Kenya (Thiele *et al.*, 2010). Elle permet un accès direct à une denrée nutritive aux communautés rurales défavorisées tout en assurant une augmentation des revenus des petits exploitants et une faible volatilité des prix des produits alimentaires (Lutaladio and Castaldi, 2009; Devaux *et al.*, 2014). Cependant, comme toutes les autres cultures, la pomme de terre subit des contraintes environnementales, biotiques (*e.g.* *Phytophthora infestans*, *Pectobacterium spp*, *virus Y*) (Hane and Hamm, 1999; Fiers *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020) qui peuvent entraîner des pertes de rendement importantes. Par exemple, les pertes liées à des infections à *Phytophthora infestans* (agent causal du mildiou de la pomme de terre) peuvent atteindre 70 % à 100 % sans utilisation de fongicides (Mekonen *et al.*, 2011; Mekonen and Tadesse, 2018). La pomme de terre subit également des contraintes abiotiques (*e.g.* froid, températures élevées, salinité, sécheresse) (George *et al.*, 2017). Les pertes de rendement dues à la sécheresse sont variables et dépendent du génotype, du stade de développement auquel a lieu le stress et de son intensité. Ainsi ces pertes peuvent varier de 11 % à 69 % (Hill *et al.*, 2021). Ces pertes de rendement dues à différents stress entraînent des baisses de revenus pour ces agriculteurs et menacent la sécurité alimentaire des communautés rurales comme au Rwanda ou au Malawi (Thiele *et al.*, 2010).



**Figure 1 : Cycle du développement des tubercules de la pomme de terre** (d'après Obidiegwu *et al.*, 2015)

Lors de la phase d'établissement de la plante les racines et les feuilles commencent à se développer (Vinichuk *et al.*, 2021). La seconde phase de développement est l'initiation des stolons, où les tiges souterraines commencent à se développer. Ensuite, l'initiation des tubercules débute, l'extrémité de certains stolons grossit et commence à former des tubercules. Ces tubercules se remplissent d'amidon, grossissent puis arrivent à maturité. C'est lors de cette phase de remplissage des tubercules, avant le début de la sénescence que le stress hydrique a le plus grand impact sur le rendement.

## **1.2. Contexte scientifique**

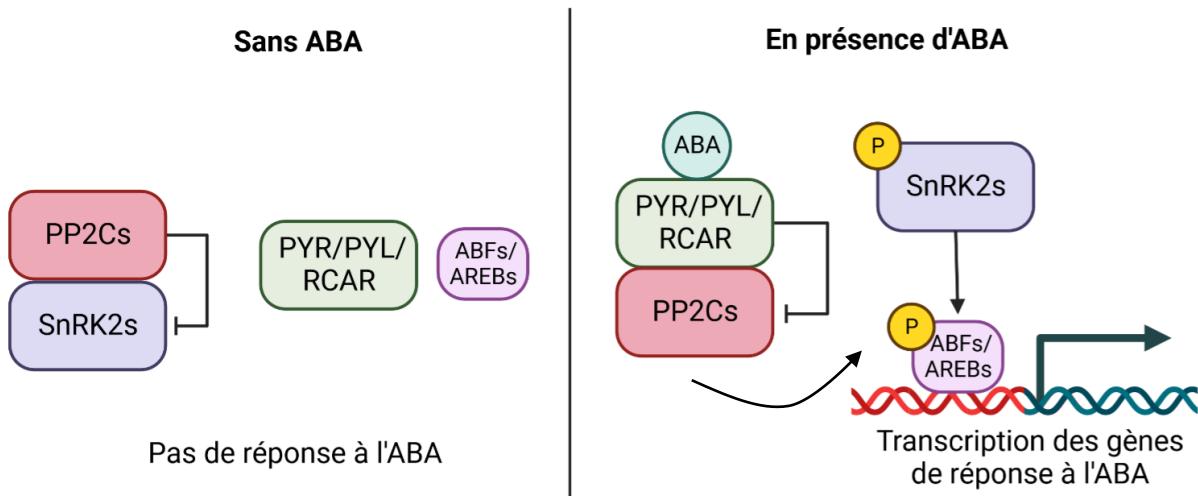
### **1.2.1. Culture de la pomme de terre**

La pomme de terre cultivée *Solanum tuberosum L.* est une espèce dicotylédone de la famille des Solanacées, tétraploïde ( $2n = 4x = 48$ ). Elle possède un système racinaire peu profond, des feuilles composées et croît généralement à partir de tubercules, se formant à l'extrémité de tiges souterraines appelés stolons (Huamán, 1980). Les tubercules mères sont plantés au printemps et les plantules émergent environ 21 jours plus tard. L'initiation des tubercules commence 21 à 42 jours après l'émergence (JAE) et les tubercules commencent à se remplir et à croître 42 à 56 JAE. Les tubercules arrivent à maturité 98 à 140 JAE, et les feuilles sont défanées 3 semaines avant la récolte des tubercules (Figure 1) (Pavlista, 1995). La durée du cycle de développement varie entre les génotypes précoces et tardifs. La production d'un kilogramme de tubercules de pomme de terre nécessite relativement peu d'eau ( $105 \text{ L kg}^{-1}$ ) par rapport à des céréales comme le riz ( $1\,408 \text{ L kg}^{-1}$ ), le blé ( $1\,159 \text{ L kg}^{-1}$ ) ou le maïs ( $710 \text{ L kg}^{-1}$ ) (Renault and Wallender, 2000). Cependant, la culture de pommes de terre nécessite une irrigation importante en dépit de sa bonne efficience d'usage de l'eau ( $9,524 \text{ kg m}^{-3}$ ), ou WUE (*Water Use Efficiency*), définie par Doorenbos and Kassam (1979) comme étant le rendement maximum par unité d'eau apportée. Avec le réchauffement climatique, les périodes de sécheresse telles que celle de 2022 (Toreti A. *et al.*, 2022) sont de plus en fréquentes et intenses (Masson-Delmotte *et al.*, 2021), ce qui est une cause majeure de pertes de rendement. Ces pertes de rendement pourraient atteindre 26 % en moyenne (Raymundo *et al.*, 2018) selon le scénario RCP 8.5 (*Representative Concentration Pathway*) qui présente les concentrations en gaz à effet de serre les plus élevées et correspond à la trajectoire actuelle si aucune mesure d'atténuation efficace n'est prise (IPCC, 2007 ; Riahi *et al.*, 2011).

### **1.2.2. Perception et signalisation**

#### **1.2.2.1. Rôle de l'ABA**

L'acide abscissique (ABA) est connu pour être impliqué dans les stress abiotiques dont la réponse au stress hydrique. La plupart des recherches sur les mécanismes régissant la perception du stress hydrique chez les plantes ont été réalisées sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, les mécanismes qui seront décrits par la suite proviennent essentiellement des recherches sur cette plante et non sur la pomme de terre. Il est cependant probable que des mécanismes similaires soient partagés entre différentes espèces végétales.



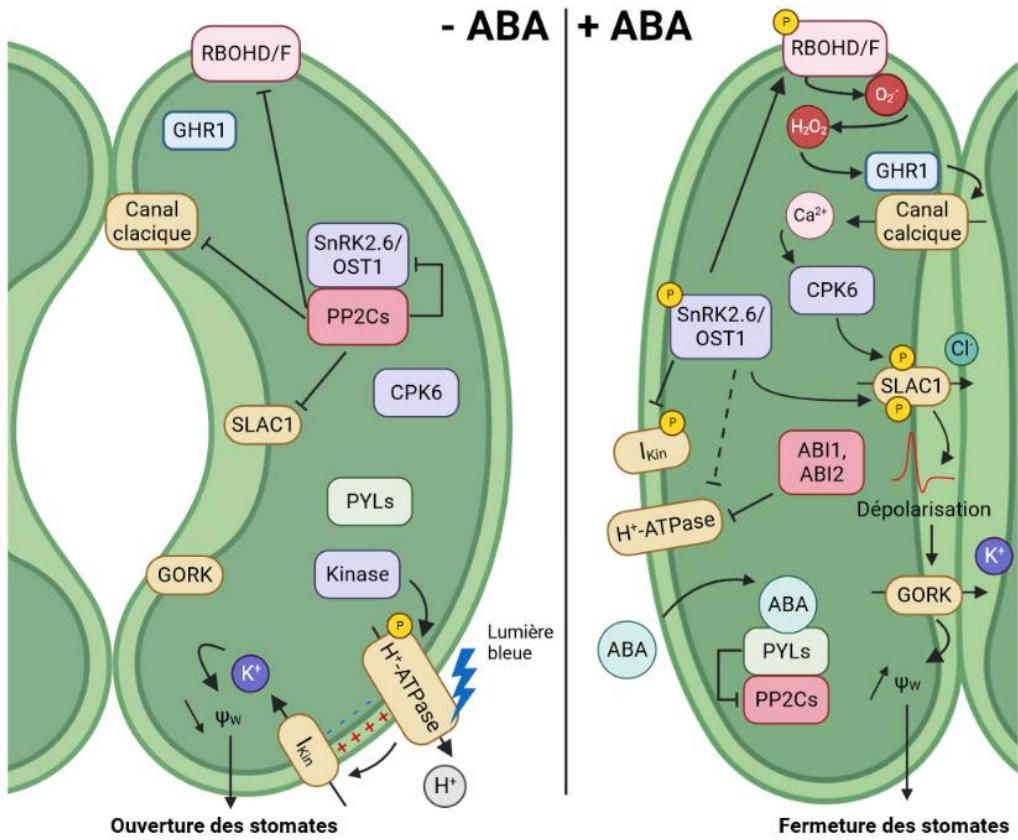
**Figure 2 : Voie de signalisation dépendante de l'ABA** (d'après Fidler *et al.*, 2022)

Les protéines de la famille *SUCROSE NON FERMENTING 1 (SNF1) – RELATED PROTEIN KINASE* (SnRK2s) sont des protéines kinases qui, lorsqu'elles sont phosphorylées, activent des facteurs de transcription nécessaires à la transcription de gènes de réponse au stress hydrique. Chez *A. thaliana*, 3 SnRK2s répondant fortement à l'ABA ont été caractérisées (SnRK2.2, SnRK2.3 et SnRK2.6). En absence d'ABA, les SnRK2s sont dé-phosphorylées et inhibées par des enzymes de la famille des phosphatases de type 2C (PP2C). Les récepteurs intracellulaires de la famille PYRABACTIN RESISTANCE 1 (PYR) / PYR-LIKE (PYL) / REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR (RCAR) sont des récepteurs de l'ABA (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). En présence d'ABA, la phytohormone se lie aux récepteurs de la famille PYR/PYL/RCAR, ce qui inhibe les PP2Cs tels que ABI1 (ABA INSENSITIVE 1) (Kundu et Gantait, 2017; Fidler *et al.*, 2022). Les SnRK2s restent phosphorylées, actives et ciblent différentes protéines. Des facteurs de transcription ABRE BINDING PROTEIN (AREB) aussi appelés ABA BINDING FACTOR (ABF) sont ainsi phosphorylés par des SnRK2s libres, et induisent la transcription de gènes présentant des éléments de réponse à l'ABA (ABRE) dans leur région promotrice (Uno *et al.*, 2000). Parmi les familles de gènes avec ces éléments, activés par des AREB/ABF, il y a notamment des facteurs de transcription de la famille MYB et des gènes codant des déhydrines (*e.g.* *RAB18*) et d'autres gènes impliqués dans la réponse à la déshydratation (*e.g.* *RD29*, *RD22*).

La sécheresse induit une diminution du potentiel hydrique dans le sol, qui est perçu par la plante au niveau des racines par des osmo-senseurs ou des mécano-senseurs (Gorgues *et al.*, 2022). Chez *Arabidopsis thaliana*, la perception de ce stress hydrique dans les racines entraîne la synthèse d'un peptide servant de signal longue distance entre les racines et les parties aériennes de la plante CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-related 25 (CLE25) (Takahashi *et al.*, 2018). Ce peptide signal migre ensuite vers les feuilles à travers le système vasculaire xylémien. Dans le système vasculaire des feuilles, ce peptide interagit avec des protéines RECEPTOR-LIKE KINASE (RLK) BARELY ANY MERISTEM 1 et 2 (BAM1 et BAM3). Cette interaction induit une augmentation de l'expression de la 9-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3 (NCED3), une enzyme clé de la biosynthèse de l'ABA.

Les acteurs permettant l'augmentation de l'expression de *NCED3* ne sont pas encore connus, mais il est suggéré que suite à l'interaction de CLE25 avec BAM1 et BAM3, ces RLK phosphorylent des facteurs de transcription non identifiés, permettant l'expression de *NCED3* (Chen *et al.*, 2021). NCED3 clive des viola-xanthines et des néo-xanthines dans les chloroplastes et génère de l'antoxhine qui est ensuite exportée dans le cytosol et convertie en aldéhyde abscissique par une déshydrogénase/réductase à courte chaîne (SDR). Enfin, l'aldéhyde abscissique est oxydé par l'aldéhyde oxydase (AAO) (Vishwakarma *et al.*, 2017; Muhammad Aslam *et al.*, 2022). Cela conduit à l'accumulation d'ABA dans les feuilles (Iuchi *et al.*, 2001 ; Endo *et al.*, 2008). L'ABA s'accumule fortement dans les feuilles en conditions de stress hydrique et joue un rôle majeur dans la fermeture des stomates et la transcription de gènes de réponse à une contrainte hydrique (Zhang *et al.*, 2006; Zhu, 2016; Soma *et al.*, 2021). Avant la synthèse d'ABA dans les feuilles, l'ABA est synthétisé dans un premier temps dans les racines puis est exporté *via* le xylème vers les parties aériennes. Cependant, bien que cet ABA d'origine racinaire puisse initier la fermeture des stomates, il n'est pas suffisant pour les maintenir fermés (Holbrook *et al.*, 2002).

En réponse à un stress hydrique, l'ABA initie des voies de signalisation impliquant différents acteurs et aboutit à la fermeture des stomates et à la transcription de gènes de réponse au stress hydrique *via* des facteurs de transcription de type ABA RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR (AREB) (Figure 2). Chez *A. thaliana*, des triples mutants n'exprimant ni *AREB1*, ni *AREB2* ni *ABF3* sont plus sensibles au stress hydrique que les témoins. Chez ces triples mutants, des gènes de réponse au stress hydrique codant des facteurs de transcription (MYB) et des protéines phosphatases HIGHLY ABA-INDUCED GENE de la famille PP2C (HAI1, HA2,



**Figure 3 : Régulation des mouvements stomatiques en présence et en absence d'ABA**

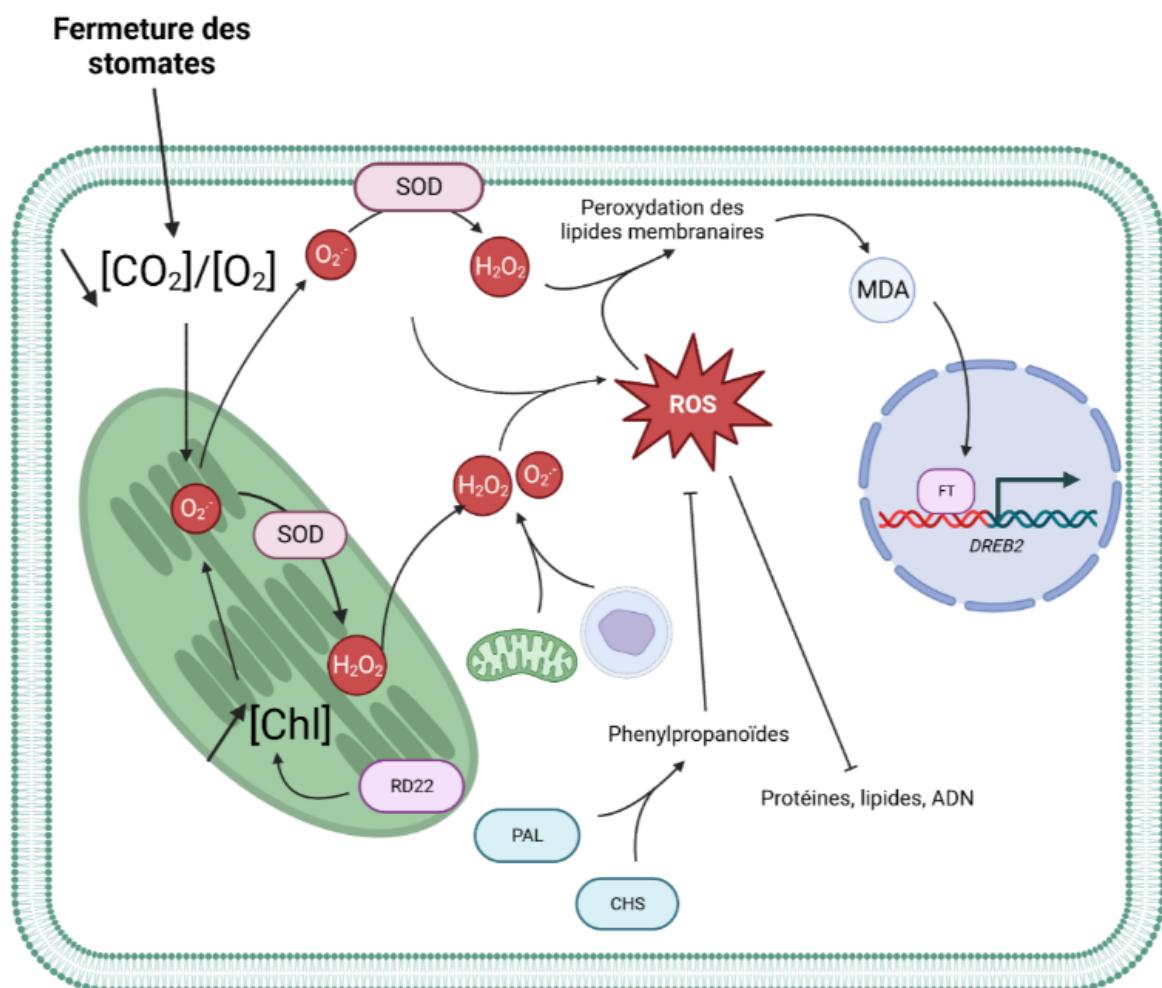
**A :** stomate ouvert. **B :** stomate fermé. Les RBOHD/F produisent l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) qui est ensuite convertit en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce dernier permet l'activation d'une *Receptor-Like Kinase* (RLK) membranaire *GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT1* (GHR1). GHR1 et le peroxyde d'hydrogène sont indispensables à l'activation des canaux calciques (Hua *et al.*, 2012). L'entrée de calcium dans les cellules de garde permet l'activation d'une protéine dépendante du calcium (CPK6) qui phosphoryle SLAC1 conjointement à SnRK2.6/OST1 (OPEN STOMATA 1) (Brandt *et al.*, 2015). La double phosphorylation de SLAC1 mène à un efflux d'anions chlorure ( $Cl^-$ ) qui contribue à la dépolarisation de la membrane plasmique et active des canaux potassiques voltage-dépendant qui produisent un efflux de potassium. GORK est un canal potassique voltage-dépendant jouant un rôle majeur dans la fermeture des stomates (Hosy *et al.*, 2003). Cette perte d'ions dans le cytoplasme des cellules de garde induit une perte d'eau et donc de turgescence menant à la fermeture des stomates (Geiger *et al.*, 2010). Outre la stimulation de la fermeture des stomates, l'ABA est aussi impliquée dans l'inhibition de leur ouverture. En absence d'ABA, des ATPases pompes à proton sont activées par phosphorylation et par la lumière bleue. Ces ATPases génèrent un gradient électrochimique négatif du côté interne de la membrane plasmique. Cette hyperpolarisation induit l'activation de canaux potassiques ( $I_{Kin}$ , *inward K<sup>+</sup> rectifying current*) permettant l'entrée d'ion  $K^+$  dans le cytoplasme. Cet influx d'ion  $K^+$  entraîne une diminution du potentiel hydrique ( $\psi_w$ ) et une entrée d'eau dans le cytoplasme, menant à une augmentation de la turgescence et à l'ouverture des stomates. En présence d'ABA, des phosphatases de la famille des PP2C (ABI1 et ABI2) sont activées, et déphosphorylent la pompe à proton (Hayashi *et al.*, 2011), ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane et participe à l'inactivation des canaux  $I_{Kin}$ . OST1 participe également à l'inactivation de  $I_{Kin}$  par phosphorylation et à l'activation de la pompe à proton par un mécanisme inconnu (Yin *et al.*, 2013).

HAI3) impliquées dans la voie de signalisation de l'ABA et des protéines de la famille LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) sont régulés négativement (Yoshida *et al.*, 2010). Cela montre que les facteurs de transcription AREB sont indispensables à la tolérance au stress hydrique. Chez la pomme de terre, des gènes codant des LEA de type 2, appelées déhydrines (DHNs) sont régulés positivement en condition de stress hydrique (Charfeddine *et al.*, 2017; Musse *et al.*, 2021). Ces protéines sont composées de nombreux acides aminés polaires, ce qui leur confère une structure désordonnée leur permettant d'agir comme des protéines chaperonnes en préservant la structure et la fonction d'autres protéines impliquées dans le métabolisme lors de différents stress abiotiques (Rorat, 2006; Hanin *et al.*, 2011). Parmi les gènes codant des DHNs, *TAS14* a été identifié comme étant un marqueur majeur du stress hydrique (van Muijen *et al.*, 2016; Musse *et al.*, 2021; Aliche *et al.*, 2022).

### 1.2.2.2. Stress oxydatif et rôle dans la signalisation

Les stress environnementaux induisent généralement un stress oxydatif secondaire, caractérisé par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Ces ROS sont produites lors de processus normaux du métabolisme comme la photosynthèse et la respiration. Parmi ces molécules, on retrouve l' $\text{O}_2^-$ , le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et le NO. Suite à un stress hydrique, une augmentation de la production de ces composés à lieu à travers une réduction excessive de la chaîne de transport des électrons et par l'augmentation de la photorespiration notamment liée à une oxygénation importante du RuBP (ribulose-1,5-biphosphate) par la rubisco en raison d'une diminution de la concentration en  $\text{CO}_2$  (Cruz de Carvalho, 2008) (Figure 4). Cette accumulation de ROS peut causer des dommages importants dans les cellules en dégradant les protéines, les lipides et l'ADN générant un stress oxydatif (Apel and Hirt, 2004). Les plantes présentent de nombreux mécanismes de détoxification des ROS et de protection contre ces derniers, leur permettant de limiter les dégâts induits par ce stress oxydatif. Outre leur caractère cytotoxique, les ROS jouent un rôle majeur dans la fermeture des stomates en permettant l'activation de canaux ioniques menant à un efflux d'ions et une perte de turgescence responsable de la fermeture des stomates (Figure 3).

Les superoxydes dismutases (SOD) mitochondrielles, chloroplastiques et de la membrane plasmique prennent en charge les ions superoxydes produits par les chloroplastes, les mitochondries et les péroxyosomes et les convertissent en peroxyde d'hydrogène (Das and Roychoudhury, 2014). Le déficit hydrique induit une augmentation de malondialdéhyde (MDA) (Gangadhar *et al.* 2016), un marqueur de la dégradation des lipides polyinsaturés par



**Figure 4 : Rôle des ROS dans la réponse à la contrainte hydrique**

**RD22** : Responsive to Dessication 22, **Chl** : Chlorophylles, **SOD** : Super Oxide Dismutase, **ROS** : Reactive Oxygen Species, **MDA** : malondialdéhyde, **FT** : Facteur de Transcription, **DREB2** : Drought Element Binding 2, **PAL** : Phénylalanine-Amonia-Lyase, **CHS** : Chalcone Synthase

péroxydation (Weber *et al.*, 2004). Le MDA peut causer une altération de la structure des protéines lorsqu'il est accumulé dans les tissus végétaux (Yamauchi *et al.*, 2008) et peut également servir de messager secondaire pour la transcription de gènes lors de stress abiotiques tels que le facteur de transcription *DREB2* (*DROUGHT RESPONSIVE ELEMENT BINDING*) (Weber *et al.*, 2004; Sakuma *et al.*, 2006) (Figure 4). Chez un génotype de pomme de terre, l'expression de *StDREB2* est induite par l'ABA, le PEG (polyéthylène-glycol) et le sel (Bouaziz *et al.*, 2012). Cependant, l'induction de son expression varie selon les génotypes et chez un autre génotype, ni *StDREB2* ni *StDREB1* n'est induit par le stress hydrique (Musse *et al.*, 2021). Les composés phénoliques dont les phénylpropanoïdes jouent également un rôle important dans la détoxicification des radicaux libres limitant la péroxydation des membranes (Hernández *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2019).

Les gènes codant une PHENYLALANINE AMONIA-LYASE (PAL) et une CHALCONE SYNTHASE (CHS), deux enzymes clés dans la synthèse de composés phénoliques, sont régulés positivement dans des feuilles de pomme de terre en condition de stress hydrique (Chen *et al.*, 2020). Cela suggère que la production de composés phénoliques en condition de stress hydrique est plus importante chez la pomme de terre. Des changements dans les contenus en chlorophylles sont également observés en condition de stress hydrique et la teneur totale en chlorophylles peut augmenter dans les jeunes et vieilles feuilles de pomme de terre (Aliche *et al.*, 2020). Ces concentrations élevées en chlorophylles pourraient mener à l'accumulation de ROS à cause de l'énergie absorbée par la chlorophylle qui peut être transférée à de l'O<sub>2</sub> induisant une photo-destruction médiée par la chlorophylle et participer à un stress oxydatif (Thomas et Smart, 1993; Hörtensteiner, 2009) (Figure 4). L'augmentation de la concentration en chlorophylles chez la pomme de terre lors d'un stress hydrique pourrait être liée à l'induction de l'expression du gène *RD22* par la déshydratation des tissus et par l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Hanana *et al.*, 2008). C'est un gène qui code une protéine qui serait impliquée dans l'inhibition de la dégradation des chlorophylles (Harshavardhan *et al.*, 2014).

#### **1.1.1.1. Impact d'un déficit hydrique sur le métabolisme des sucres**

Lors d'un déficit hydrique, le métabolisme du carbone dans les plantes peut aussi être perturbé. En effet, un découplage entre l'activité photosynthétique et la croissance est généralement observé et se traduit par un maintien ou une augmentation des concentrations en carbone dans les tissus végétaux (Muller *et al.*, 2011). L'accumulation de carbone au dépend de la croissance des tissus se fait sous forme de composés solubles, (*e.g.* saccharose, hexoses, proline, citrate), ou sous forme des éléments structuraux (*e.g.* lignine, cellulose). L'augmentation des composés



solubles peut permettre un ajustement osmotique dans les tissus et ainsi maintenir une turgescence. L'augmentation des composés structuraux participe à l'épaississement de la paroi cellulaire et de la feuille, limitant la transpiration et maintenant l'intégrité des tissus face à une éventuelle perte de turgescence.

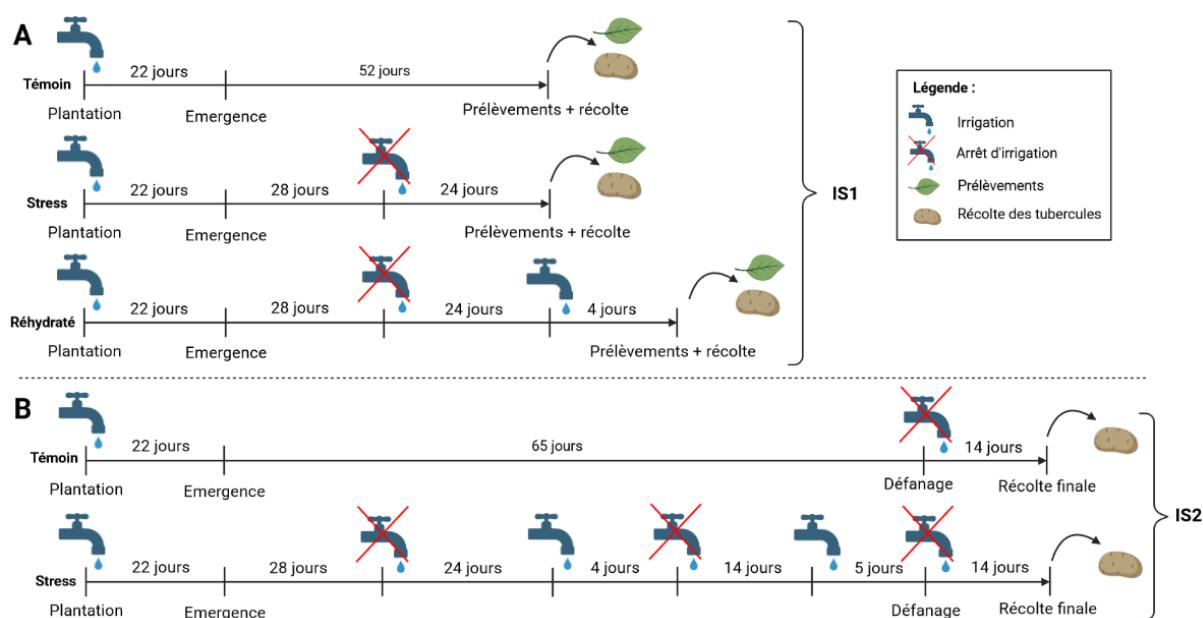
Aliche *et al.* (2020), ont montré une expression plus importante de *SnRK1* dans les feuilles des plants de pomme de terre ayant subi un déficit hydrique comparativement aux plants témoins. *SnRK1* est une protéine kinase impliquée dans le métabolisme du carbone. *SnRK1* promeut la tolérance aux stress en partie par l'inhibition de la protéine kinase TARGET OF RIFAMPICINE (TOR) impliquée dans les processus de croissance. *SnRK1* permet donc d'économiser de l'énergie en inhibant ces processus couteux. *SnRK1* permet l'augmentation de l'activité de SUCROSE SYNTHASES (SUSY) dégradant le saccharose en fructose et en UDP-Glucose et favorise également la synthèse d'amidon. (Peixoto and Baena-González, 2022). Dans des feuilles de pomme de terre stressées, Aliche *et al.* (2020) ont montré une augmentation de l'expression de *SUS3*, un gène codant une SUSY. Ces résultats suggèrent une augmentation de la dégradation du saccharose et sont corrélés avec une tendance à la diminution des contenus en saccharose observée par les auteurs.

### **1.3. Contexte du stage et objectifs**

Ce stage s'inscrit dans le cadre du projet IMPOTSTRESS, mené par Maverick GOUEROU, doctorant co-encadré par Agroscope en Suisse et l'UMR IGEPP de l'INRAE en France. Ce projet vise à identifier des marqueurs de sensibilité et de tolérance à un déficit hydrique chez la pomme de terre. Pour cela, différentes expérimentations en serre et au champ ont eu lieu. En 2022, un essai en serre sur 4 génotypes contrastés (Agria, Kennebec, Jule et Lady-Claire) a été mis en place et des mesures physiologique et morphométriques ont été réalisées pour étudier les conséquences d'un déficit hydrique chez la pomme de terre. Des folioles ont été prélevées pour des analyses biomoléculaires et biochimiques. L'essai mis en place cette année est réalisé sur les mêmes génotypes. L'objectif de ce stage est d'identifier les différences d'expression de gènes ciblés induits potentiellement dans les feuilles de pomme de terre en condition de déficit hydrique et après ré-irrigation chez les 4 génotypes étudiés par rapport à une condition témoin. Il s'agira de déterminer si les profils d'expression des gènes, obtenus par qPCR pour chacun des génotypes, sont associés à une meilleure tolérance au déficit hydrique ou au contraire à une plus forte sensibilité. Dans un objectif de mise au point de la technique de qPCR sur folioles, les analyses porteront dans un premier temps sur des folioles de pomme de terre stressées

**Tableau 1 :** Précocité et sensibilité des tubercules des 4 génotypes de pomme de terre utilisés (d'après les essais réalisés en 2021).

Génotype	Précocité	Comportement face au déficit hydrique	Fournisseur	Pays
<b>Agria</b>	Tardif	Résistant	Germicopa	France
<b>Kennebec</b>	Tardif	Sensible	Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Pays- Bas
<b>Lady Claire</b>	Précoce	Sensible	Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Pays- Bas
<b>Jule</b>	Précoce	Résistant	Solana/Saka-ragis	Allemagne



**Figure 5 : Dispositif d'application du déficit hydrique.**

**A :** Essai IS1 : prélèvements et récolte après une période de déficit hydrique, pendant la phase de remplissage des tubercules

**B :** Essai IS2 : prélèvements et récolte après deux périodes de déficit hydrique, à la fin de la maturation des tubercules.

prélevées en 2022. L'étude porte sur l'expression par qPCR de 8 gènes décrits dans la littérature comme étant impliqués dans la réponse à un déficit hydrique (*AREB1*, *AREB2*, *DREB2*, *TAS14*, *RD22*, *HSP100*, *SnRK1* et *SUSY*). La qPCR permet une quantification des ARNs cibles relative à l'expression de gènes de référence, exprimés au même niveau pour toutes les conditions testées. Les données moléculaires obtenues seront mises en perspective avec des données de rendement. Dans ce rapport nous cherchons à déterminer si les profils d'expression des gènes de réponse au stress hydrique peuvent être associés à une résistance agronomique au déficit hydrique, c'est-à-dire à une limitation des pertes de rendements.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal et dispositif expérimental

L'essai sur lequel portent les analyses décrites dans ce rapport a eu lieu à l'IGEPP (Domaine de la Motte, Le Rheu, France) de janvier à avril 2022. Dans cet essai, quatre génotypes de pommes de terre ont été choisis (Agria, Kennebec, Lady Claire et Jule) suite à des essais en serre et au champ réalisés en 2021 car ils présentaient une gamme contrastée de précocité et de résistance au stress hydrique (Tableau 1). Les plants de génotypes précoces présentent des signes de sénescence plus tôt que les génotypes tardifs. La résistance se réfère ici à de faibles pertes de rendement en condition de déficit hydrique (<30 %) et la sensibilité désigne des pertes de rendement importantes en condition de déficit hydrique (>30%). Des demi-tubercules de pomme de terre préalablement conservés à 4°C puis prégermés à l'obscurité ont été plantés à 25 cm de profondeur au centre de pots en plastique de 25 L (Airpot®, 27 cm de diamètre et 50 cm de haut). Les pots ont été remplis avec un mélange de terreau sableux (40 % v/v) et de mousse de tourbe (60 % v/v) additionnée d'argile (40 kg.m<sup>-3</sup>) et d'engrais NPK (0,7 kg.m<sup>-3</sup> PG-MIX 14-16-18). Ce substrat permet une déshydratation rapide du sol. Le pH du sol est à 5,8 ± 0,2 et la conductivité électrique Ec(1/1,5) = 0,7 mS.cm<sup>-1</sup>. La température et la luminosité de la serre sont contrôlées pour avoir 14h de jour à 21°C et 10h de nuit à 18°C. Les premiers plants ont émergé 22 jours après la plantation.

#### 2.1.1. Dispositif pour l'évaluation du stress hydrique

L'essai servant aux prélèvements de folioles pour les analyses biomoléculaires et à la récolte de tubercules pour mesurer le rendement est composé de 60 plants de pomme de terre (5 plants pour chacun des 4 génotypes et des 3 conditions d'irrigation). On note cet essai IS1 (IMPOTSTRESS 1). Les folioles et les tubercules sont prélevés pendant la phase de remplissage



des tubercules 52 JAE. Les tubercules de ces plants sont également récoltés pour établir des corrélations entre l'expression des gènes et le rendement lors de la phase de remplissage des tubercules. La mise en place des conditions d'irrigation de cet essai est décrite Figure 5A. L'ensemble des 60 plants a été irrigué en permanence par un système d'irrigation automatique dispensant 6 arrosages de 70 ml par jour, espacés de 2h depuis la plantation jusqu'à 28 JAE. Les 20 plants de la condition témoin ont continué à être irrigués jusqu'aux prélèvements. Les 20 plants stressés ont subi un déficit hydrique par un arrêt d'irrigation 28 JAE sur une période de 24 jours. Les 20 plants ré-irrigués ont subi un déficit hydrique par un arrêt d'irrigation 28 JAE sur une période de 24 jours puis ont été ré-irrigués pendant 4 jours. En parallèle, 72 autres plants (9 plants pour chacun des 4 génotypes et des 2 conditions d'irrigation) sont suivis pour permettre de mesurer le rendement final et ainsi vérifier le caractère tolérant ou sensible au déficit hydrique des génotypes étudiés. On note cet essai IS2. La mise en place de l'irrigation de ces plants est décrite Figure 5B. Les plants témoins sont irrigués en permanence avec 6 arrosages de 70 ml par jour toutes les 2 heures depuis la plantation au défanage. Les 36 plants stressés ont subi 2 périodes de déficit hydrique et de ré-irrigation. La mise en place du premier déficit hydrique à lieu 28 JAE avec un arrêt d'arrosage durant 24 jours, suivi d'une ré-irrigation pendant 4 jours. L'arrosage est ensuite arrêté pendant 14 jours puis les plants sont ré-irrigués jusqu'au défanage.

Une irrigation avec 250 ml d'eau fertilisée (Liquoplant® 3 %) 14 JAE a été réalisée sur l'ensemble des 132 plants. Les 72 plants utilisés pour la récolte finale ont reçu un second arrosage avec de l'eau fertilisée 52 JAE. Afin de contrôler les conditions d'irrigation, l'humidité du sol est évaluée en temps réel avec 16 sondes capacitives Yara®. Dans cette étude, le déficit hydrique est caractérisé par une humidité dans le sol inférieure à 10 %, ce qui a lieu environ une semaine après l'arrêt de l'irrigation. Les plants de pomme de terre stressés ont ainsi subi une période de déficit hydrique de deux semaines.

### **2.1.2. Prélèvements**

Pour étudier l'expression des gènes de réponse à un déficit hydrique, une foliole du troisième rang foliaire le plus jeune a été prélevée 52 JAE sur l'essai IS1. Ce prélèvement est réalisé sur chacune des 5 plantes de chacune des 4 génotypes et des 3 conditions d'irrigation. Chaque foliole est placée dans un tube numéroté puis immédiatement congelée dans l'azote liquide avant d'être stockée à -80°C jusqu'au broyage. Sur ces mêmes plants, et à la même date, les tubercules sont récoltés pour évaluer si le déficit hydrique induit un impact significatif sur le rendement en cours d'élaboration.

**Tableau 2 : Listes des amorces**

	Nom du gène	Référence gène	Sens	Séquence (5'-3')	Taille amorce	Taille amplicon	Tm (°C)	Référence
Gènes cibles	<i>StAREB1</i>	XM_006346349	forward	GGCTCAAGGCGGAGTTATG	19	125	58,3	(Musse et al., 2021)
			reverse	GGGAAGGTGAAAGAGACGATG	21		58,38	
	<i>StAREB2</i>	XM_015312047	forward	CAGAACCATCAACCACAGCA	20	143	58,39	(Musse et al., 2021)
			reverse	ATACCAACCATTCCCTACCCCT	21		58,3	
	<i>StDREB2</i>	JN125858	forward	AAAGCAGAGGGAACACCAAAC	20	128	58,31	(Musse et al., 2021)
			reverse	GGGAAGAATAAGAACCAAGCCA	22		58,3	
	<i>StTAS14</i>	XM_015304540	forward	TGGCACTCAAGGTAGCGG	18	175	59,34	(Musse et al., 2021)
			reverse	TCCTCCTCTGGCATTTCT	20		59,66	
	<i>StRD22</i>	JX839749	forward	CACACAGTTAGCAAGAGCAAAG	22	93	58,12	(Musse et al., 2021)
			reverse	GGTATCCAAGTGACAAACAGCA	22		58,85	
	<i>StHSP100</i>	XM_006338326	forward	GCAAGTTATGTTGACCAGCC	21	105	58,05	(Musse et al., 2021)
			reverse	GCCGTGCTGAAATGCGA	18		58,44	
	<i>StSnRK1</i>	NM_001318610.1	forward	GTAGCCAATGAGACAGGCCT	20	156	60,11	(Aliche et al., 2020)
			reverse	TGGCTCCTTGCGAAATCCT	20		59,96	
	<i>StSUSY</i>	NM_001288308.1	forward	AAAGCTGCTGAGCTCATGGT	20	138	59,96	(Aliche et al., 2020)
			reverse	AGTCATCAGCCTCTCCGAGT	20		60,03	
	<i>StEXPLB1</i>	PGSC0003DMG400026590	forward	GGTCATGCAGAAGTGGAGC	20	228	59,19	(Chen et al., 2020)
			reverse	GCCACGGGAGCTTAGAATGA	20		59,82	
	<i>StPAL-5</i>	PGSC0003DMG401021549	forward	GAGCTGGAATGGTGCTCTC	20	174	60,46	(Chen et al., 2020)
			reverse	CTTGGCACCTTAGTTGAGCC	20		58,83	
Gènes de référence	<i>StRPL2</i>	DQ252497	forward1	GAGGGAGAGAGAGAGAGAGAG	22	100	57,92	(Musse et al., 2021)
			reverse1	GGTGGTGGGTATGGGATTG	20		54,55	
	<i>StRPL2</i>	CK259681.1	forward2	GGCGAAATGGGTGCTGTTAT	20	121	58,62	(Saubreau et al., 2014; Thomas et al., 2019)
			reverse2	CATTCTCTCGGCCGAAATCG	20		57,36	
	<i>StEF1α</i>	AB061263	forward	GATGATCCCCACCAAGCCA	20	107	60,03	(Musse et al., 2021)
			reverse	TGACAACACCGCAGCAACA	20		60,39	
	<i>StACTIN</i>	DQ252512	forward1	GTGTGATGGTGGGTATGGGT	20	200	59,38	(Musse et al., 2021)
			reverse1	GGCTTCAGTTAGGAGGACAGG	21		59,79	
	<i>StACTIN</i>	DQ252512	forward2	CATCTGTCCTCTTAACCTGAAGCC	24	170	62,49	(Saubreau et al., 2014; Thomas et al., 2019)
			reverse2	TCACCAAGTCCAACACAATACCG	24		62,59	
	<i>StGAPDH</i>	NM_001288348	forward	TGCTCCTATGTTGTCGTTGG	21	177	58,58	(Musse et al., 2021)
			reverse	TTCTGAGTGGCTGTGATGGA	20		58,65	
	<i>TUBST1</i>	609267-Z33382.1	forward	ATGTTAGGGCGCAAGGCTT	19	101	60,6	(Saubreau et al., 2016)
			reverse	TCTGCAACCGGGTCATTAT	20		59,67	
	<i>StCox1-B</i>	X83206.1	forward	TCATCTCGGTGCCATTGCT	20	218	60,04	(Barra et al., 2019)
			reverse	AGGCGCACCTATCAGAATCG	20		59,97	
	<i>cyclophilin</i>	AF126551.1	forward	CACTCCAAAACCGCTGAGA	20	110	60,25	(Barra et al., 2019)
			reverse	GGATCACACGGTGGAGGTT	20		59,96	
	<i>aprt</i>	CK270447	forward	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA	20	121	59,97	(Nicot et al., 2005)
			reverse	GAAGCAATCCCAGCGATACG	20		59,14	
ADN	<i>IPM4</i>		forward	GTACTGGAGAGCTAGTAGTGTCA	24			(Bendahmane et al., 1997)
			reverse	ACCACTGGCAAATGGCCATACGA	23			
	<i>BCH</i>		forward	CATGACATAGTTGAATTTGAGTC	25	~290		(Galek et al., 2011)
			reverse	CGTTGGCGCTGCCGTAAGTT	21			

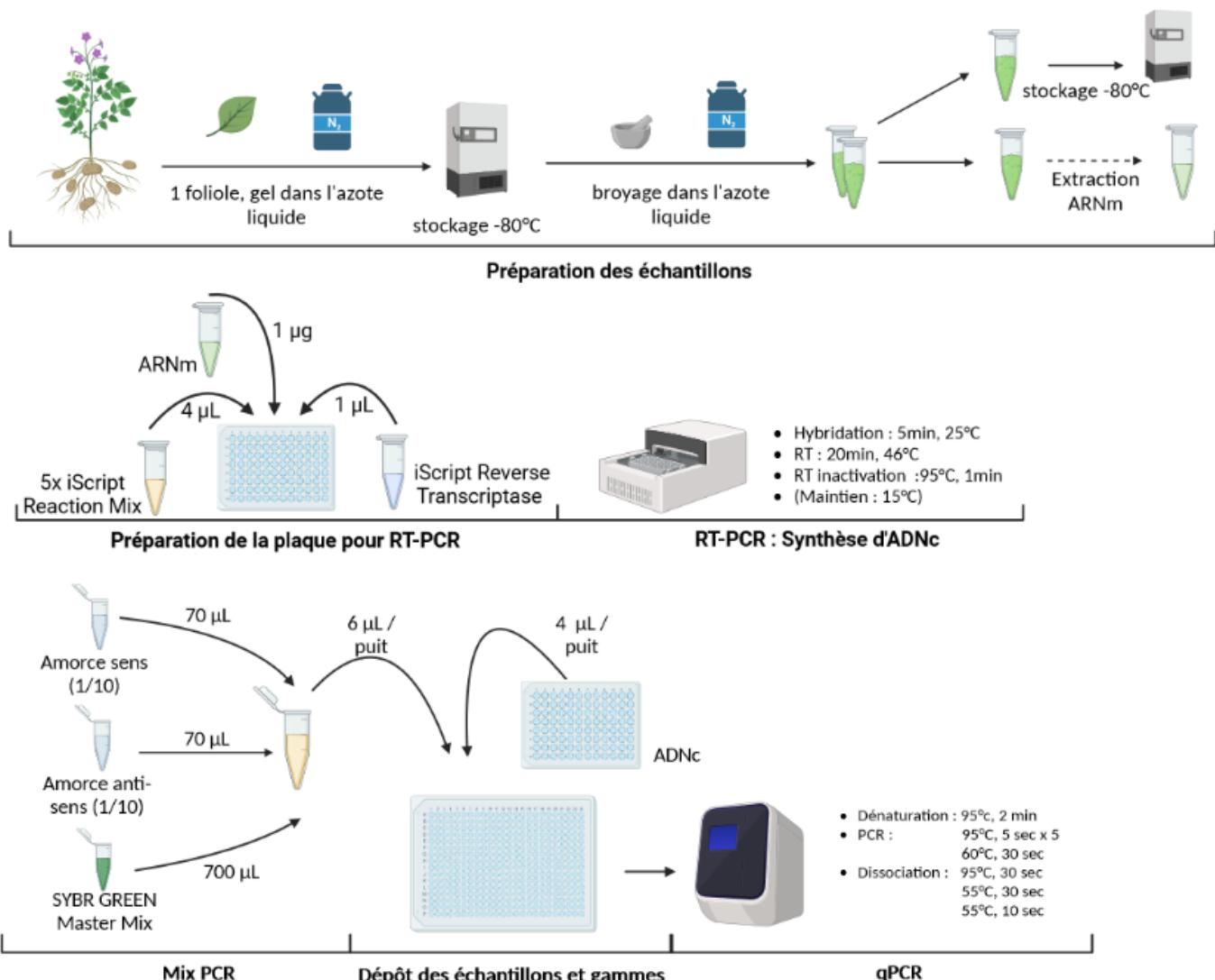
Dans le but de réaliser un contrôle positif pour l'amplification d'ADN génomique et de tester la spécificité des amores des gènes cibles et des gènes de référence sur les génotypes de pomme de terre étudiées, des folioles ont été prélevées en 2023 sur un autre essai du projet IMPOTSTRESS. Cet essai, que l'on note IS3, porte sur les mêmes génotypes et présente les mêmes conditions d'irrigation. Deux folioles de 2 plants témoins de chacun des 4 génotypes sont prélevées et congelées dans de l'azote liquide. Les deux folioles de plants différents pour un génotype donné constituent un échantillon, il y a donc 4 échantillons provenant de l'essai IS3.

## **2.2. Extraction d'ADN et électrophorèse**

Les 4 échantillons prélevés sur l'essai IS3 sont broyés dans l'azote liquide au mortier et au pilon et l'ADN génomique est extrait à l'aide du kit NucleoSpin® Plant II (Macherey Nagel®) selon les instructions du fabricant. Le broyat subit une lyse cellulaire avec un tampon de lyse. Les ARNs sont dégradés grâce à l'ajout de RNase A, la suspension est incubée 10 min à 65°C. Le lysat obtenu est placé sur une colonne contenant un filtre pour retenir les débris cellulaires. La colonne est centrifugée 2 min à 11 000 x g. Le filtrat obtenu est additionné de tampon pour préparer la liaison de l'ADN à la membrane de silice. Le mélange est déposé sur une colonne contenant une membrane de silice puis est centrifugé 1 min à 11 000 x g. Trois étapes de lavage sont réalisées pour éliminer les contaminants en ajoutant un tampon de lavage et en centrifugeant. L'ADN est élue deux fois successivement avec 50 µL de tampon d'élution (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). L'ADN est amplifié par PCR en point final par deux couples d'amores IPM4 et BCH (Tableau 2). Ces couples d'amores ont été choisis car la migration sur gel d'agarose des produits de PCR amplifiés par ces amores sur de l'ADN de feuille de pomme de terre montre des bandes clairement identifiables (Sylvie Marhadour, INOV3PT, communication personnelle ; Bendahmane *et al.*, 1997; Galek *et al.*, 2011). Une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %) est réalisée pour faire migrer les produits de PCR.

## **2.3. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc**

Sur les 5 folioles prélevées par génotype et par condition d'irrigation de l'essai IS1, 3 ont été sélectionnées aléatoirement afin de mettre au point la technique de qPCR pour amplifier potentiellement des gènes de réponse à un déficit hydrique chez la pomme de terre. Ce sont donc 36 échantillons de l'essai IS1 qui ont été analysés.



**Figure 6 : Protocoles pour l'analyse de l'expression des gènes de réponse à un déficit hydrique chez la pomme de terre**

Chaque échantillon de l'essai IS1 congelé est broyé dans l'azote liquide au mortier et au pilon puis est stocké à -80°C jusqu'aux extractions d'ARN. Les ARN des échantillons de l'essai IS1 et les 4 échantillons de l'essai IS3 sont extraits avec le kit NucleoSpin® RNA Plus (MACHEREY-NAGEL) à partir de la poudre obtenue après broyage. Un tampon de lyse est ajouté à chaque échantillon. Le lysat obtenu est transféré sur une colonne puis est centrifugé 30 sec à 11 000 x g pour retenir les débris cellulaires et l'ADN génomique. Une solution de liaison est ajoutée au filtrat qui est alors déposé sur une nouvelle colonne pour la liaison des ARNs avant d'être centrifugé 15 sec à 1 000 x g. Trois lavages successifs sont réalisés pour éliminer les molécules pouvant polluer les ARNs (solvants, protéines, molécules organiques) une solution de lavage à base de chlorure de guanidium et d'éthanol est utilisée pour le premier lavage. Le chlorure de guanidium est un agent chaotropique permettant de dénaturer les protéines restantes. Une solution sans chlorure de guanidium est utilisée pour les deux derniers. Deux élutions successives avec 30 µL d'eau dépourvue de RNase sont réalisées. Les ARNs sont donc récoltés dans un volume total de 60 µL. Pour mesurer la qualité et la quantité des ARNs extraits ils sont dosés au Nanodrop™ puis déposés sur un gel d'agarose à 1,5% pour une électrophorèse. Les ARNs dont les concentrations sont inférieures à 125 ng/µL sont reconcentrés par centrifugation sous vide à 30°C pour arriver à un minimum de 125 ng/µL. Un traitement à la DNase I (Thermo Scientific) est réalisé pour supprimer l'ADN génomique restant. Une PCR est réalisée sur ces échantillons traités à la DNase I avec le couple d'amorce BCH (Tableau 2). Un seul couple d'amorces est utilisé car les bandes présentes sur le contrôle positif étaient très marquées. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose (1,5 %) pour une électrophorèse afin de vérifier l'absence d'ADN génomique dans les échantillons traités à la DNAse. Un contrôle positif est présent pour chaque génotype avec les ADNs extraits des folioles prélevées dans l'essai IS3. La synthèse d'ADNc est réalisée par RT-PCR avec le kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) dans une plaque 96 puits selon les instructions du fabricant. L'enzyme utilisée dans ce kit une transcriptase inverse modifiée, provenant du rétrovirus de la leucémie murine et est mélangée avec un inhibiteur de RNase. Le mélange pour la réaction est composé d'oligo dT et d'amorces aléatoires hexamériques. 1 µg d'ARN de chaque échantillon est déposé dans un puit de la plaque avec les amorces et la transcriptase inverse. La plaque est incubée dans un thermocycleur selon le programme suivant : hybridation 5 min à 25°C ; transcription inverse 20 min à 46°C ; inactivation de l'enzyme 1 min à 95°C puis maintien à 15°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B	LC-3	LC-3	LC-9	LC-9	LC-15	LC-15	J-6	J-6	J-12	J-12	J-18	J-18	A-141	A-141	A-147	A-147	A-153	A-153	K-144	K-144	K-150	K-150	K-156	K-156
C	LC-21	LC-21	LC-27	LC-27	LC-33	LC-33	J-24	J-24	J-30	J-30	J-36	J-36	A-51	A-51	A-57	A-57	A-63	A-63	K-54	K-54	K-60	K-60	K-66	K-66
D	LC-81	LC-81	LC-87	LC-87	LC-93	LC-93	J-84	J-84	J-90	J-90	J-96	J-96	A-111	A-111	A-117	A-117	A-123	A-123	K-114	K-114	K-120	K-120	K-132	K-132
E	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O
F	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O
G																								
H																								
I	LC-3	LC-3	LC-9	LC-9	LC-15	LC-15	J-6	J-6	J-12	J-12	J-18	J-18	A-141	A-141	A-147	A-147	A-153	A-153	K-144	K-144	K-150	K-150	K-156	K-156
J	LC-21	LC-21	LC-27	LC-27	LC-33	LC-33	J-24	J-24	J-30	J-30	J-36	J-36	A-51	A-51	A-57	A-57	A-63	A-63	K-54	K-54	K-60	K-60	K-66	K-66
K	LC-81	LC-81	LC-87	LC-87	LC-93	LC-93	J-84	J-84	J-90	J-90	J-96	J-96	A-111	A-111	A-117	A-117	A-123	A-123	K-114	K-114	K-120	K-120	K-132	K-132
L	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O
M	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O	1/10	1/10	1/30	1/30	1/90	1/90	1/270	1/270	1/810	1/810	H2O	H2O
N																								
O																								
P																								

Figure 7 : Plan de plaque 384 puits

Lignes B et I : témoin. Ligne C et J : stress. Ligne D et F : ré-irrigation. Lignes E, F, L et M : gammes de dilution. Les cDNA du génotype Lady-Claire sont indiqués en orange, ceux de Jule en gris, ceux de Agria en bleu et ceux de Kennebec en jaune.

gène 1

gène 2

## 2.4. qPCR

L'expression des gènes est évaluée par qPCR, dans un volume réactionnel de 10 µL en utilisant du Universal SYBR® GREEN SuperMix (BioRad). Les amores décris dans le Tableau 2 sont utilisées pour l'amplification des gènes de référence (10 gènes de référence ont été testés) et les gènes cibles, à une concentration de 10 µM. Les séquences de ces amores proviennent de la littérature et ont été construites sur le génome diploïde de référence de la pomme de terre. Les gènes cibles ont été choisis car il a été montré que leur expression est modifiée en condition de déficit hydrique (Aliche *et al.*, 2020; Musse *et al.*, 2021). 4 µL de chaque ADNc est déposé en duplicita pour chaque couple d'amores. Pour chaque puit, un mélange contenant 5 µL de MasterMix, 0,5 µL d'amore sens et 0,5 µL d'amore antisens est déposé. Un mélange de l'ensemble des ADNc est préparé pour chaque génotype puis est dilué au dixième. Une gamme de dilution au tiers est réalisée pour chaque génotype et chaque gène à partir de ces mélanges d'ADNc dilués. L'ensemble des amores des gènes cibles et des gènes de référence sélectionnés est testé sur les échantillons de l'essai IS3 pour vérifier la spécificité des amores et déterminer le nombre de cycles à partir duquel les amplicons sont détectés (*Ct*). La spécificité est évaluée par l'allure de la courbe des pics de fusion. Pour les 10 gènes de référence, seuls les couples d'amores étant spécifiques et présentant les *Ct* les plus bas sont ensuite testés sur les échantillons de l'essai IS1, soit 6 gènes.

Par rapport aux calculs réalisés par geNorm et détaillés en Annexe I, le niveau d'expression des gènes cibles est normalisé seulement avec les gènes *EF1* et *ACTINE* (Tableau 2). Pour les gènes analysés sur les échantillons de l'essai IS1, chaque qPCR est réalisée en plaque 384 puits selon le plan de plaque présenté Figure 7, avec un thermocycleur LightCycler® II 480 (Roche).

## 2.5. Analyse de données

### 2.5.1. Expression relative des gènes

L'expression relative des gènes est calculée en prenant en compte l'efficacité de l'amplification (*E*) pour chacun des génotypes et des gènes étudiés. L'expression relative *QR* du gène cible *j* pour un échantillon donné *i* est calculée à partir de l'efficacité *E* déterminée pour un génotype *g* et un gène donné *j* et du *Ct* de chaque échantillon *i* (Equation 1).

$$QR_{ij} = E_{gj}^{-Ct_{ij}} \quad (1)$$

Afin de limiter les biais de quantification liés à des différences de concentration en ARN entre les échantillons et des efficacités variables de la RT PCR pouvant être dus à des inhibiteurs de



PCR, il est indispensable de normaliser l'expression des gènes calculée pour chaque échantillon par celle de gènes de référence. Les gènes de référence ont une expression constitutive qui ne varie théoriquement pas selon les conditions environnementales ou d'un génotype à l'autre. On sélectionne alors les gènes de référence pour lesquels il y a le moins de variations entre les échantillons. Cette sélection est réalisée à partir de geNorm, une application en Virtual Basic pour Microsoft Excel, développée par Vandesompele *et al.* (2002). Pour chaque échantillon, un facteur de normalisation est déterminé et permet de calculer une expression relative normalisée  $QRN$ . Pour faciliter l'interprétation de ces résultats, les ratios de l'expression  $R$  des gènes  $j$  pour une condition  $k$  et un génotype  $g$  sont calculés à partir de la moyenne de l'expression relative normalisée des gènes de la condition témoin (Equation 2).

$$R_{jgk} = \frac{\overline{QRN}_{jgk}}{\overline{QRN}_{jg,\text{témoin}}} \quad (2)$$

L'expression des gènes pour la condition témoin est arbitrairement fixée à 1 et permettra la comparaison des témoins aux autres conditions d'irrigation.

### 2.5.2. Calcul du rendement

Les pertes de rendement  $P$  (en pourcents) ont été calculées à partir de la masse moyenne (en grammes) de tubercules récoltés  $\bar{m}$  par plant et par génotype  $g$  entre la condition témoin et la condition de stress ou de ré-irrigation ( $k$ ) selon l'équation 3.

$$P_g = \frac{\overline{m}_{g,\text{témoin}} - \overline{m}_{gk}}{\overline{m}_{g,\text{témoin}}} \times 100 \quad (3)$$

### 2.5.3. Analyses statistiques

L'effet de la condition d'irrigation sur l'expression de chaque gène au sein de chaque génotype est testé. L'hypothèse d'homoscédasticité des données (homogénéité des variances entre conditions) est testée avec un test de Bartlett pour chaque gène et chaque génotype. Si cette hypothèse est vérifiée un modèle linéaire est créé et l'hypothèse de normalité des résidus de ce modèle est testée. Si cette hypothèse est vérifiée, une ANOVA est réalisée. Si un effet de la condition sur l'expression des gènes est détecté, alors un test post-hoc de Tukey-HSD est réalisé afin de comparer les conditions deux à deux. Si l'hypothèse d'homoscédasticité des données ou de normalité des résidus du modèle linéaire n'est pas vérifiée, alors un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est réalisé. Si un effet de la condition d'irrigation sur l'expression du gène est détecté, alors un test post-hoc non-paramétrique de Wilcoxon est réalisé afin de comparer

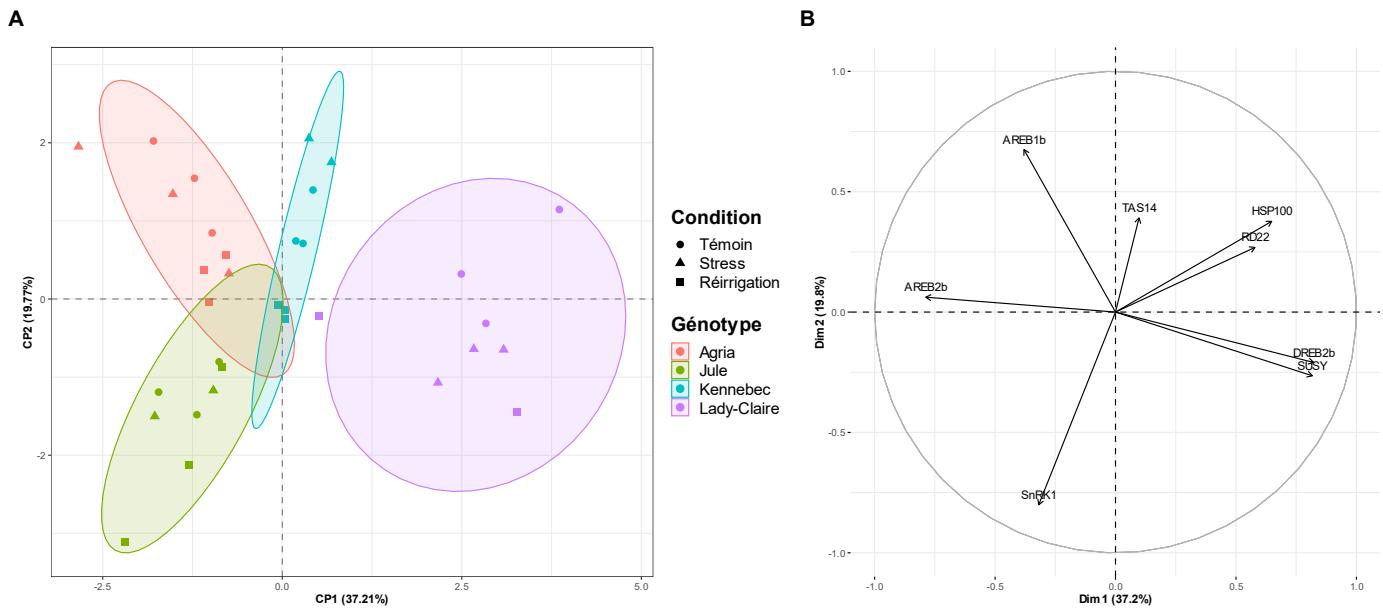
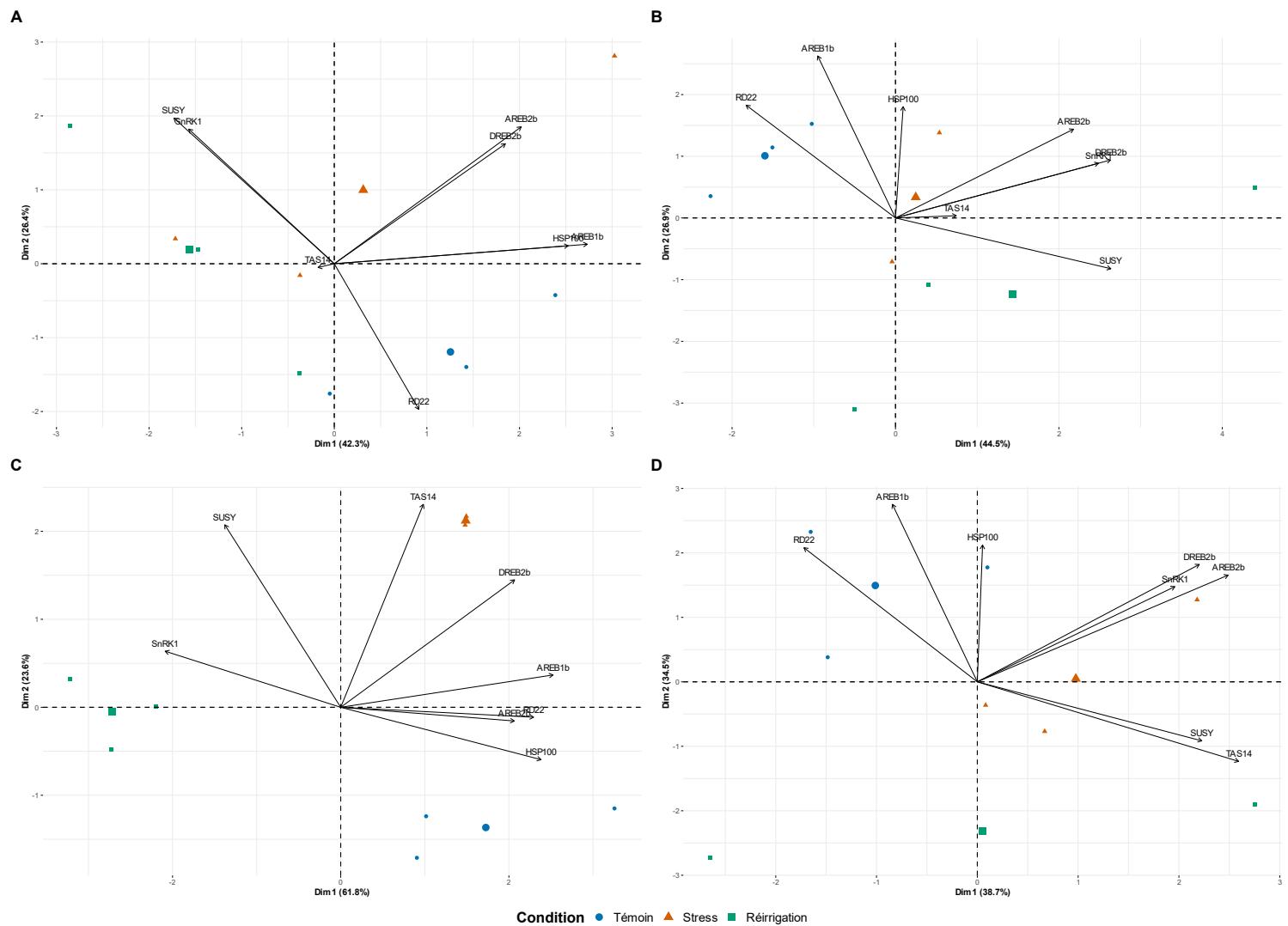


Figure 8 ACP sur l'ensemble des 33 échantillons.



Figures 9 : ACP réalisées au sein de chaque génotype  
A : Agria, B : Jule, C : Kennebec, D : Lady-Claire

les expressions de gènes deux à deux. L'effet du stress hydrique sur le rendement est testé sur les données de rendement IS1 et IS2 par une ANOVA. Des comparaisons deux à deux sont ensuite réalisées par un test de TukeyHSD pour les données de rendement IS1. Une ANOVA ou un test de Wilcoxon est réalisé sur les données de rendement IS2 au sein de chaque génotype selon la validité des hypothèses d'homoscédasticité des données et de normalité des résidus. Des tests de corrélation sont ensuite réalisés entre l'expression de chacun de ces gènes et le rendement. La normalité des données est vérifiée par un test de Shapiro-Wilk et si les données sont normales sont normales pour les deux paramètres à corrélérer alors un test de corrélation de Pearson est réalisé. Sinon c'est un test non paramétrique de Kendal qui est réalisé.

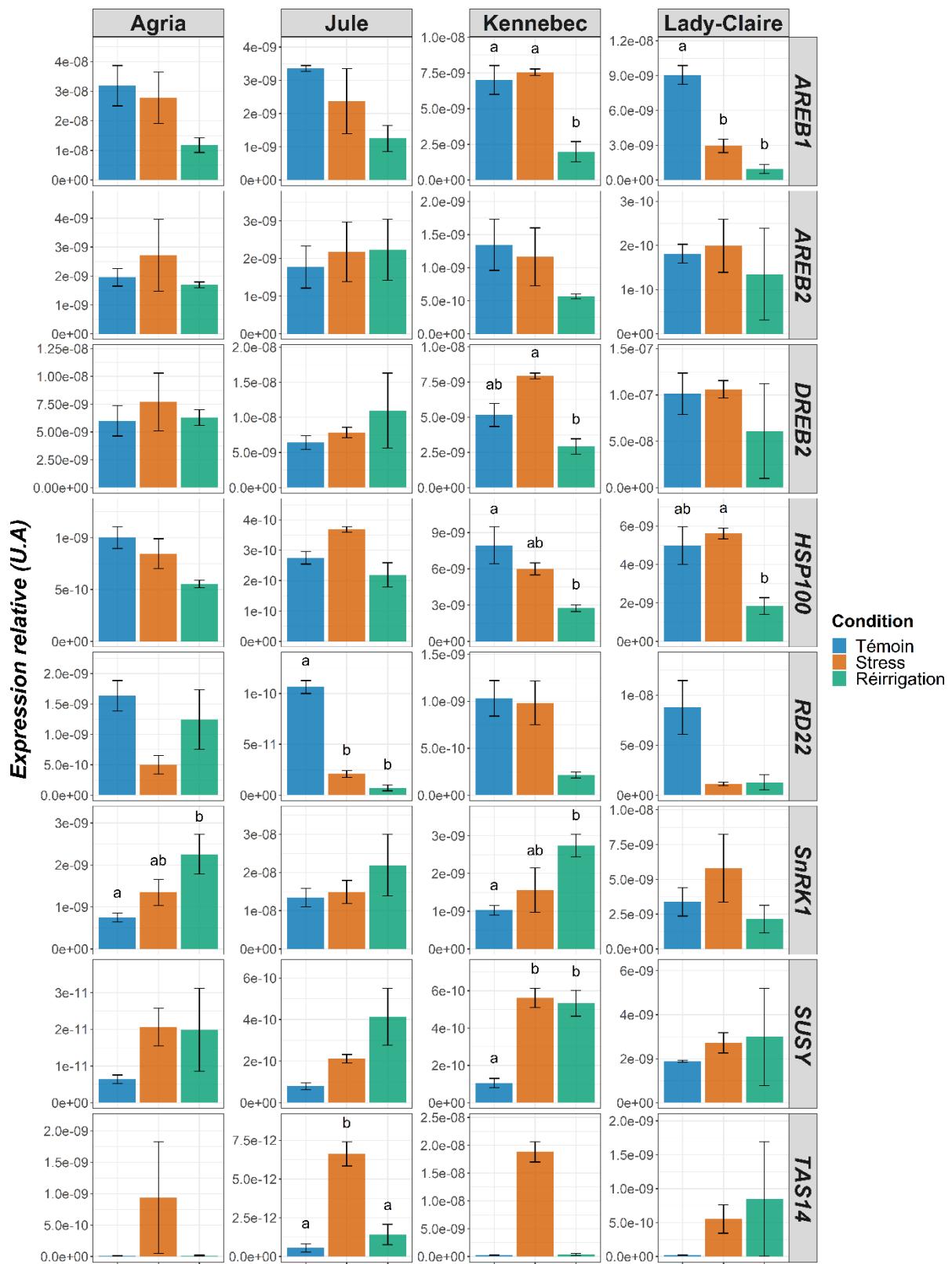
### **3. Résultats**

#### **3.1. Optimisation de qPCR**

Afin de mettre en place des qPCR, il a fallu sélectionner des gènes de référence et vérifier également la spécificité de l'amplification des amores de tous les gènes. (Tableau 2). L'ensemble des couples d'amores a été testé sur les échantillons prélevés sur l'essai IS3 afin d'évaluer leur la spécificité des amores. Ainsi, d'après les valeurs de *Ct* les moins élevées et les profils des pics des courbes de fusion (Annexe IIa), sur les 10 gènes de référence testés, 6 ont été retenus pour être évalué sur les échantillons IS2 (*APRT*, *ACTINE*, *EF1*, *CYCLOPHYLINE*, *COX* et *GAPDH*). Les gènes *EF1* et *ACTINE* ont été identifiés comme étant les plus stables à l'aide de geNorm c'est-à-dire que leur niveau d'expression, varie peu entre les conditions et entre les génotypes. Trois échantillons dont les ARNs ont été extraits avec un autre kit ont été retirés car ils induisent des pics dans les profils de *Ct* des gènes de référence sélectionnés (Annexe IIb), et empêchent le calcul du facteur de normalisation par geNorm. Par conséquent, une répétition de la condition de stress pour Jule et pour Kennebec est absente, ainsi qu'une répétition pour la condition de ré-irrigation chez Lady-Claire. Parmi les amores des gènes cibles, *PAL-5* et *CHS* n'ont pas été re-testées sur les échantillons IS2 car il ne restait pas suffisamment d'ADNc

#### **3.2. Analyse par Composante Principale**

Une Analyse par Composante Principale (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des données d'expression des 8 gènes, comprenant les 3 échantillons par génotype et modalité de stress afin de distinguer si les données de l'expression des gènes pouvaient être regroupées par génotype ou par condition d'irrigation. Cette ACP met en évidence un regroupement par génotype plutôt



**Figure 10 : Expression relative des gènes de réponse à un déficit hydrique selon les conditions et le génotype**

Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 échantillons. Des lettres différentes indiquent les différences significatives entre les conditions pour chaque panneau ( $p < 0,05$ , TukeyHSD). Les échelles sont propres à chaque panneau.

que par condition d'irrigation (Figure 8A) mais elle explique seulement 56 % de la variabilité de l'expression des gènes (37,2 % sur l'axe 1 et 18,7 % pour l'axe 2). Les échantillons du génotype Lady-Claire sont ceux qui sont le plus séparés des autres génotypes. Cette représentation montre également que les gènes *DREB2* et *SUSY* et les gènes *HSP100* et *RD22* sont respectivement regroupés 2 à 2 alors que les gènes *AREB1*, *AREB2*, *SnRK1*, et *TAS14* ne sont associés à aucun autre gène (Figure 8B). Pour distinguer un éventuel effet de la condition d'irrigation sur l'expression des gènes pour un génotype donné, des ACPs ont été réalisées par génotype. (Figure 9). Pour le génotype Agria, les échantillons témoins sont regroupés et séparés des échantillons stressés et réirrigués qui ne sont pas clairement distincts. On observe un regroupement entre les gènes *SUSY* et *SnRK1*, *AREB2* et *DREB2*, *AREB1* et *HSP100*. Pour les trois autres génotypes, les échantillons témoins, stressés, et réhydratés sont bien séparés mais la répartition des gènes est différente : (i) pour le génotype Jule : les gènes *SnRK1*, *DREB2* et *AREB2* sont regroupés ; (ii) pour le génotype Kennebec : les gènes *RD22*, *AREB2* et *HSP100* sont regroupés et (iii) pour le génotype Lady-Claire, les gènes *SUSY* et *TAS14* d'une part et les gènes *SnRK1*, *DREB2* et *AREB2* sont regroupés Pour ce génotype il est à noter que si les échantillons sont bien séparés selon la condition, une dispersion importante est observée pour la condition de ré-irrigation.

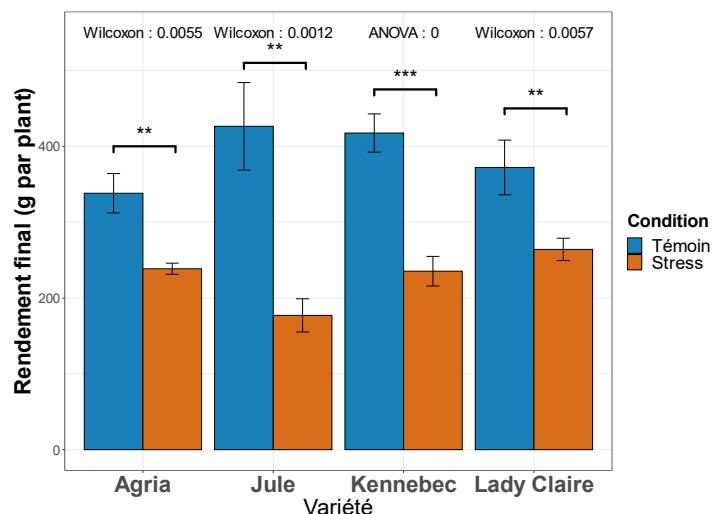
### **3.3. Expression relative**

L'hypothèse posée pour cette étude était que l'expression des gènes choisis pouvait être modulée en fonction de l'état de stress de la plante. Pour répondre à cette hypothèse une qPCR a été réalisée sur 8 gènes exprimés dans 4 génotypes différents et selon 3 conditions : témoin, stress hydrique et ré-irrigation. Les valeurs d'expression normalisées de chacun des gènes pour chacun des génotypes et des conditions sont représentées Figure 10. Il est à noter que cette expression est très variable en fonction du gène et du génotype. L'expression de *AREB2* ne présente aucune différence significative quelle que soit le génotype et la condition ( $p > 0,05$ ). Les expressions de *TAS14* et de *RD22* varient uniquement pour le génotype Jule mais pas dans le même sens en fonction des conditions. L'expression de *TAS14* est plus élevée en condition de stress qu'en condition témoin ( $p = 0,00230$ ) ou de ré-irrigation ( $p = 0,00454$ ). L'expression de *RD22* est significativement plus faible en condition de stress ( $p = 1,74\text{-}04$ ) et en condition de ré-irrigation ( $p = 4,81\text{-}05$ ). Les expressions de *DREB2* et *SUSY* varient seulement pour le génotype Kennebec mais également de façon différentielle. L'expression de *DREB2* est plus faible chez les ré-irrigués que chez stressés ( $p = 0,00904$ ) et celle de *SUSY* est plus élevée chez

**Tableau 2 : Pertes de rendement moyennes 79 JAE**

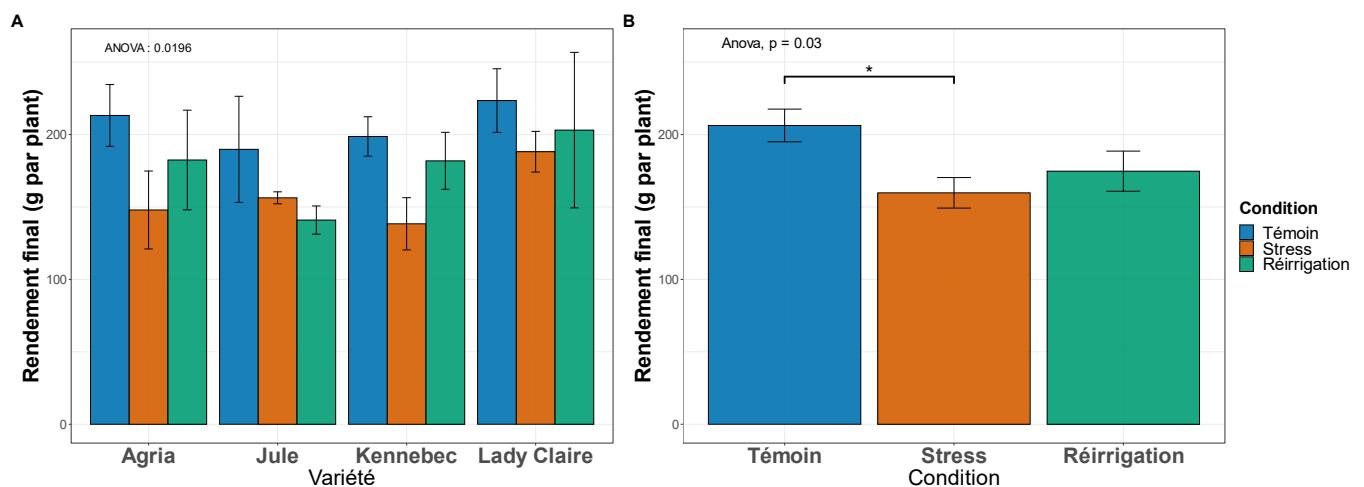
Génotype	Pertes (%)	Pertes (g)	se <sup>1</sup> <	p-value	<sup>2</sup> signif.	Test statistique
Agria	29,45	99,57	27,00	0,0055	**	Wilcoxon
Jule	58,47	249,33	61,68	0,0012	**	Wilcoxon
Kennebec	43,63	182,16	31,89	3,451e-05	***	ANOVA
Lady-Claire	29,04	108,09	38,93	0,0057	**	Wilcoxon

<sup>1</sup>se : erreur standard associée aux pertes en grammes. <sup>2</sup>Significativité \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01, \*\*\* : p-value < 0,001 ; test de Wilcoxon ou ANOVA)



**Figure 11 :** Rendements finaux (IS2) par génotype et par condition (récolte 79 JAE)

(\* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01, \*\*\* : p-value < 0,001 ; test de Wilcoxon ou ANOVA ; n = 9 plants par condition et par génotype).



**Figure 12 :** Rendements IS1 (récolte 52 JAE) des 33 plants dont les folioles ont été prélevées pour les analyses par qPCR.

**A :** Rendements par génotype et par condition (ANOVA : p < 0,05 ; TukeyHSD p > 0,05)

**B :** Rendements par condition (ANOVA : p < 0,05 ; TukeyHSD p = 0,0283 (\*))

les stressés ( $p = 0,00514$ ) et les réirrigués ( $p = 0,00419$ ) que chez les témoins. L'expression de *AREB1* et *HSP100* tendent à diminuer entre témoins et réirrigués pour Kennebec ( $p = 0,01440$  et  $p = 0,0324$ , respectivement) et Lady Claire ( $p = 0,00116$  et  $p = 0,0671$ , respectivement). Cependant, chez Kennebec, l'expression de *AREB1* n'est pas modifiée en condition de déficit hydrique par rapport au témoin ( $p = 0,90300$ ) alors qu'elle diminue chez Lady-Claire ( $p = 0,00252$ ). Chez Agria seule l'expression de *SnRK1* augmente significativement du témoin au réirrigué ( $p = 0,0429$ ) comme chez Kennebec ( $p = 0,0219$ ). Afin d'analyser plus finement les différences observées Figure 10, les ratios des expressions de gènes entre les conditions de stress et de ré-irrigation par rapport à la condition témoin (dont l'expression vaut arbitrairement 1) ont été calculés (Annexe III). Quand ces ratios indiquent respectivement une augmentation ou une diminution minimale d'un facteur 2 par rapport au témoin on considère qu'il y une tendance à une expression différente entre la condition témoin et la condition testée. Ils correspondent aux valeurs présentées entre parenthèses dans le texte ci-dessous (ratio  $\pm$  l'erreur standard).

### 3.2.1 Expression différente entre témoin et stressé

Chez le génotype Jule, l'expression de *RD22* est 5 fois plus faible ( $0,20 \pm 0,17$  ;  $p = 1,74\text{e-}04$ ) dans les folioles des plants stressés que dans celles des témoins. Chez Jule, l'expression de *TAS14* est 12 fois supérieure à celle du témoin en condition de stress ( $11,97 \pm 0,51$  ;  $p = 0,00230$ ), c'est une tendance qui est observée chez les trois autres génotypes (Agria :  $67,73 \pm 0,99$  ; Kennebec :  $82,70 \pm 0,18$  ; Lady-Claire :  $23,46 \pm 0,42$ ). Le fait que l'expression de ce gène soit élevée en condition de stress permet également de valider que les méthodes employées pour la qPCR sont valides car il est connu comme étant un marqueur important du stress hydrique (van Muijen *et al.*, 2016; Musse *et al.*, 2021; Aliche *et al.*, 2022).

Chez le génotype Kennebec, l'expression de *SUSY* est 5 fois plus élevée en condition de stress ( $5,30 \pm 0,25$  ;  $p = 0,00514$ ) qu'en condition témoin. Cette tendance est retrouvée chez les génotypes Agria ( $3,22 \pm 0,31$ ) et Jule ( $2,66 \pm 0,23$ ).

Chez le génotype Lady-Claire, l'expression du gène *AREB1* est 3 fois plus faible en condition de stress ( $0,32 \pm 0,21$  ;  $p = 0,00252$ ). Cette diminution n'est pas observée chez les autres génotypes testés.

### 3.2.2 Expression des gènes chez les réirrigués

Chez le génotype Agria et le génotype Kennebec, l'expression de *SnRK1* est significativement plus élevée dans les jeunes folioles des plants réirrigués que dans celles des plants témoins.

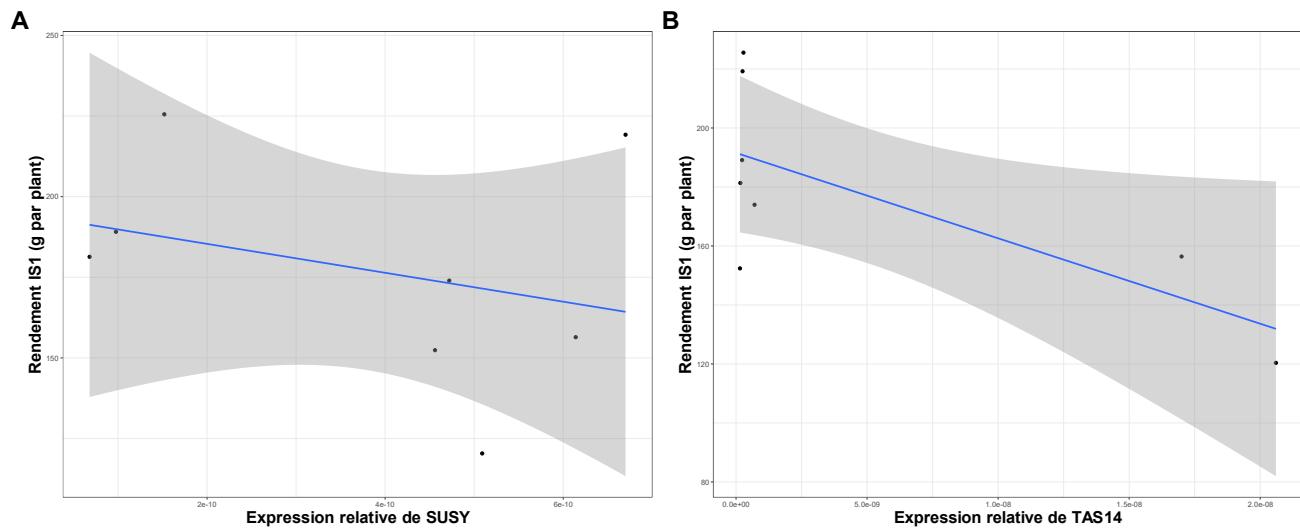


Cette expression est 3 fois plus élevée chez Agria ( $3,22 \pm 0,31$  ;  $p = 0,0429$ ) et 2,5 fois plus élevée chez Kennebec ( $2,67 \pm 0,16$  ;  $p = 0,0219$ ). Cette tendance n'est pas observée chez les deux autres génotypes.

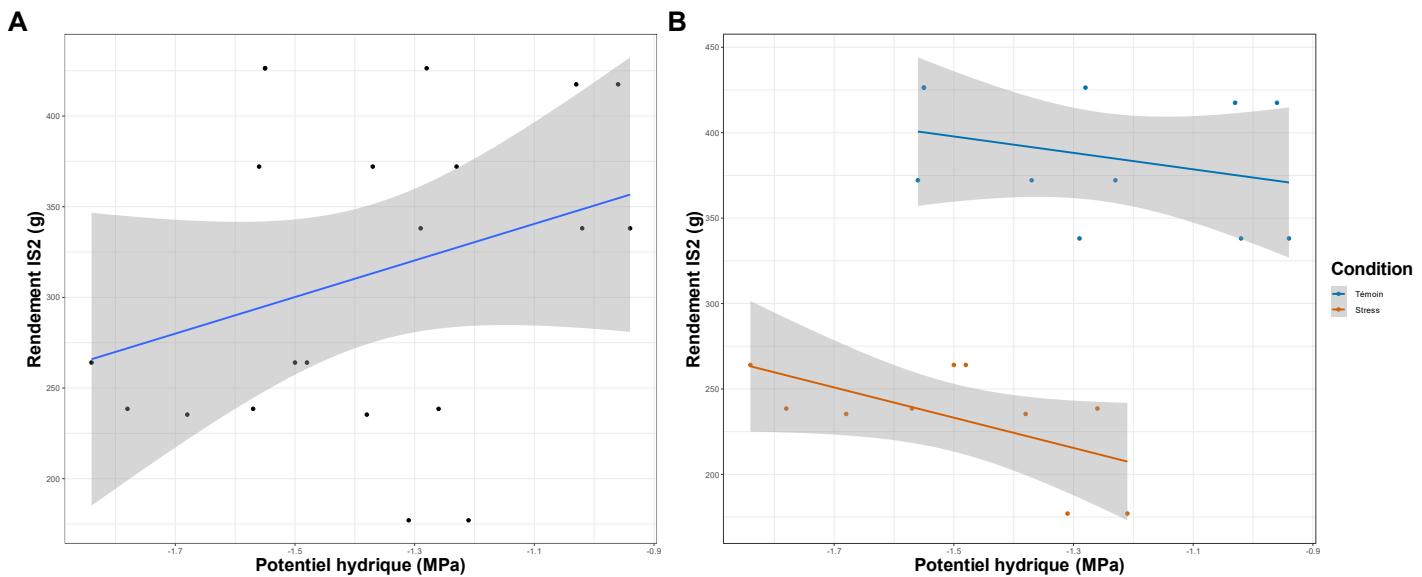
Chez le génotype Jule, l'expression de *RD22* est 14 fois plus faible chez les réirrigués que chez les témoins ( $0,07 \pm 0,39$  ;  $p = 4,81\text{e-}05$ ). Cette tendance est également observée chez les génotypes Kennebec ( $0,21 \pm 0,24$ ) et Lady-Claire ( $0,15 \pm 0,66$ ). Chez Jule, l'expression de *TASI4* chez les réirrigués est significativement différente de l'expression chez les stressés. On observe cette tendance chez les génotypes Agria et Kennebec mais pas chez Lady-Claire où l'expression de *TASI4* chez les réirrigués tend à être plus élevée comparativement aux témoins ( $35,94 \pm 1,01$ ). Chez les génotypes Kennebec et Lady-Claire, l'expression de *AREB1* est significativement plus faible en condition de ré-irrigation par rapport à la condition témoin. Cette expression est 3,5 fois plus faible pour le génotype Kennebec ( $0,28 \pm 0,38$  ;  $p = 0,01440$ ) et 3 fois plus faible pour le génotype Lady-Claire ( $0,32 \pm 0,21$  ;  $p = 0,00116$ ). La même tendance est observée chez les génotypes Agria ( $0,37 \pm 0,38$ ) et Jule ( $0,37 \pm 0,32$ ). Chez le génotype Kennebec, l'expression de *DREB2* est significativement plus faible en condition de ré-irrigation par rapport à la condition de stress ( $p = 0,00904$ ). Chez le génotype Kennebec, l'expression de *HSP100* est 2,5 fois plus faible entre la condition témoin et la condition de ré-irrigation ( $0,37 \pm 0,31$  ;  $p = 0,0324$ ). Chez le génotype Kennebec, comme en condition de stress, l'expression de *SUSY* est 5 fois plus élevée en condition de ré-irrigation qu'en condition témoin ( $5,03 \pm 0,27$  ;  $p = 0,00419$ ). Cette tendance est également observée chez le génotype Jule ( $5,21 \pm 0,39$ ) et Agria ( $3,11 \pm 0,31$ ). Chez le génotype Lady-Claire, l'expression de *HSP100* est significativement plus faible en condition de ré-irrigation qu'en condition de stress ( $p = 0,0352$ ).

### 3.3. Déficit hydrique et rendement

Le rendement obtenu pour chacun des génotypes a été calculé respectivement au cours du développement à 52 JAE pour évaluer l'effet de la ré-irrigation après un stress et à 79 JAE (rendement final). Les pertes de rendement sont définies comme la différence entre le rendement obtenu en condition témoin et celui obtenu en condition de déficit hydrique. A 79 JAE, un impact significatif du stress hydrique est observé sur le rendement final pour chaque génotype (Figure 11 et Tableau 3). Les génotypes Jule et Kennebec sont les génotypes pour lesquels la plus grande différence de rendement a été observée avec des pertes de 58,47 % ( $p = 0,0012$ ) et 43,63 % ( $p = 3,451\text{e-}05$ ) respectivement. Les pertes de rendement les moins importantes sont observées pour Agria (29,45 % ;  $p = 0,0055$ ) et Lady-Claire (29,04 % ;  $p = 0,0057$ ).



**Figure 13 : Corrélations entre le rendement final (IS1) et l'expression de SUSY (A) et de TAS14 (B) chez Kennebec.**



**Figure 14 : Corrélations entre le rendement final (IS2) et le potentiel hydrique**  
**A :** Ensemble des données. **B :** Données regroupées par condition.

Pour les données de rendement obtenues au cours du développement des tubercules (52 JAE) aucune différence significative n'a été observée entre conditions au sein d'un même génotype (Figure 12A), bien qu'un effet global ait été observé sur le rendement. Cependant, une différence de rendement significative a été observée entre la condition témoin et la condition stressée tous génotypes confondus ( $p = 0,0283$  ; Figure 12B) et correspond à 22,55 % de pertes.

### **3.4. Corrélations potentielles entre expression et rendement**

Afin de déterminer si le niveau de stress est corrélé avec le rendement final, des tests de corrélation ont été réalisés entre le potentiel hydrique (indicateur du niveau de stress) et le rendement. Aucun des tests de corrélation entre le rendement final et le potentiel hydrique sur l'ensemble des données (Figure 14A) ou par condition (Figure 14B) n'a montré de corrélation significative ( $p > 0,05$ ).

Pour déterminer si l'expression des gènes ciblés pouvait être corrélée au rendement 52 JAE, ou identifier si au moins un gène peut être associé à une tolérance ou à une sensibilité au déficit hydrique. Des régressions linéaires multiples ont été réalisées. Les ordres de grandeur d'expression de chaque gène variant d'un génotype à l'autre, un modèle de régression linéaire a été réalisé pour chaque génotype. Les données de rendement correspondent aux tubercules des mêmes plants sur lesquels ont été prélevés les folioles pour réaliser les qPCR.

Sur les quatre modèles de régression linéaire multiple, seul celui pour Kennebec a pu être ajusté. C'est un modèle pour lequel le critère AIC minimisé vaut 44,26 et où le rendement peut être expliqué par l'expression de *TAS14*, *DREB2*, *SUSY* et *AREB1*. Il y a une corrélation négative significative entre l'expression des gènes *TAS14* ( $p = 0,0261$ ), *SUSY* ( $p = 0,0369$ ) et le rendement. Les corrélations entre *TAS14* (test de Kendal,  $\tau = -0,142871$ ), *SUSY* (test de Pearson,  $r = -0,3060986$ ) et le rendement sont faibles et négatives (Figure 13).

## **4. Discussion**

Avant de discuter des résultats obtenus, il convient de rappeler que cette expérimentation est une étude préliminaire, réalisée sur seulement 3 répétitions par génotype et condition. Par conséquent, ces résultats seront à confirmer par des expérimentations complémentaires. Pour rappel, l'objectif de ce projet était d'identifier les gènes potentiellement marqueurs du stress hydrique parmi les gènes étudiés. Notre hypothèse est que des gènes marqueurs s'exprimeraient différemment entre une condition témoin et une condition de stress hydrique et ce quels que soient les génotypes.



Nous avons aussi vérifié les caractères de résistance et de sensibilité au stress hydrique en évaluant le rendement final en grammes de tubercules. Nos résultats ont montré que les génotypes Jule et Kennebec sont plutôt sensibles au déficit hydrique et que les génotypes Agria et Lady-Claire sont plutôt tolérants au déficit hydrique. Ces données entrent en contradiction avec les données des essais précédents où le génotype Jule avait été décrit comme résistant et le génotype Lady-Claire comme sensible. C'est pourquoi l'analyse de l'expression des gènes décrite ci-dessous est discutée par rapport à ces caractéristiques de résistance et non pas par rapport à celles décrites dans le Tableau 1.

L'ACP a montré que le génotype Lady-Claire était séparé des trois autres. Cependant cette séparation des génotypes pourrait être liée à la méthode de normalisation utilisée pour les qPCR, et ne reflète pas nécessairement le comportement de Lady-Claire face à un déficit hydrique. En effet, le choix a été fait de normaliser par gène et par génotype afin de prendre en compte la spécificité de chaque génotype, et l'efficacité de l'amplification spécifique à chaque génotype. Les gènes dont les flèches pointent vers les échantillons de Lady claire (Figure 8) (*DREB2*, *SUSY*, *HSP100*, *RD22*) sont également ceux dont l'expression relative normalisée est la plus élevée par rapport aux autres génotypes. Pour limiter cet effet, et peut être avoir des ordres de grandeur similaires dans l'expression des gènes, une solution aurait été d'effectuer une gamme de dilutions pour évaluer l'efficacité de la qPCR sur un « pool » d'échantillons de l'ensemble des génotypes étudiés. Ce protocole est couramment utilisé pour comparer l'expression de gènes de défense dans différents génotypes en réponse à des stress biotiques (Thomas *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2020)

Nos résultats montrent (i) que tous les gènes ne sont pas exprimés différemment chez tous les génotypes (ii) que quand ils sont exprimés ce n'est pas de la même façon et (iii) que l'expression des gènes est fortement dépendante des génotypes.

Il est intéressant de noter que pour les deux gènes codant des facteurs de transcription en réponse à l'ABA, la réponse observée pour *AREB1* est cohérente avec celle de la littérature, en particulier pour le génotype Lady-Claire où l'expression diminue avec un stress comme c'est le cas chez le génotype Rosanna (Musse *et al.*, 2021). C'est un point intéressant car ces deux génotypes sont décrits comme étant modérément résistantes au déficit hydrique. En revanche pour *AREB2*, on n'observe aucun changement dans l'expression du gène, quels que soient les conditions ou le génotype alors que dans des travaux précédents, chez le génotype Rosanna, (Musse *et al.*, 2021) ont montré que l'expression de *AREB2* est régulée positivement en condition de stress (20 jours à 20 % de la capacité au champ). Compte tenu de



ces résultats, l'expression de *AREB2* pourrait être liée à un effet génotype ; à une différence d'application du stress et/ou à une expression plus précoce de *AREB2*. Un marqueur potentiellement intéressant est *TAS14* dont l'expression est significativement plus élevée en condition de déficit hydrique par rapport à la condition témoin ou réirriguée chez Jule et avec des tendances similaires chez Agria et Kennebec. Chez Lady Claire on retrouve cette tendance uniquement entre témoins et stressés. *TAS14* appartient à la famille des déhydrines, des protéines polaires agissant comme chaperonnes, et exprimées en condition de stress hydrique, il est donc attendu de retrouver cette protéine surexprimée en condition de stress hydrique. Ce résultat est cohérent avec la littérature scientifique où *TAS14* a été identifié chez plusieurs génotypes de pomme de terre comme étant régulé positivement en condition de stress hydrique (van Muijen *et al.*, 2016; Musse *et al.*, 2021; Aliche *et al.*, 2022). Par contre, il est peu probable que l'expression de *TAS14* ait un impact négatif sur le rendement compte tenu de la faible corrélation obtenue entre les deux. La surexpression de *TAS14* et les pertes de rendement sont plutôt des conséquences du stress hydrique global subi par les plantes.

Quels que soient les génotypes, l'expression du gène *DREB2* n'est pas modifiée en conditions de stress hydrique par rapport au témoin. *DREB2* est un facteur de transcription induit en réponse à une stress hydrique (Sakuma *et al.*, 2006). Ce gène a été choisi car il était surexprimé en conditions de stress chez le génotype Nicola (Bouaziz *et al.*, 2012) mais non modifié chez le génotype Rosanna (Musse *et al.*, 2021) comme dans nos résultats.

Contrairement aux résultats obtenus pour le génotype Rosanna (Musse *et al.*, 2021) où *HSP100* était fortement surexprimé aucune modification de ce gène n'est observée entre les témoins et les stressés quelle que soit le génotype. Ce gène code une protéine chaperonne de la famille Clp/HSP100 (Casein lytic protein / Heat Shock Protein 100) qui remodèle, désassemble ou agrège des complexes protéiques (Sauer *et al.*, 2004; Burton and Baker, 2005). D'après Lee *et al.* (2007), dans une étude menée chez *A. thaliana*, la protéine ClpB3 est localisée dans les chloroplastes et est indispensable pour leur développement. Par contre, il existe pour ce gène une forte tendance à la diminution dans les conditions de réirrigation chez Kennebec et Lady-Claire suggérant l'existence d'un mécanisme indépendant de *HSP100* dans la protection des chloroplastes. L'expression de *RD22* est plus faible chez Jule ainsi que chez Lady-Claire entre la condition témoin et les conditions de stress et de ré-irrigation. *RD22* est un gène dont la transcription est induite par la déshydratation de tissus et par l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Hanana *et al.*, 2008). Ces résultats sont inattendus car il a été montré



que *RD22* est plus fortement exprimé en condition de stress chez *Arabidopsis thaliana* mais aussi chez le génotype de pomme de terre Rosanna (Musse *et al.*, 2021). *RD22* est un gène impliqué dans l'inhibition de la dégradation de la chlorophylle (Harshavardhan *et al.*, 2014). Etant réprimé dans les deux génotypes précoce de notre essai, il est possible qu'il induise une accélération de la dégradation de la chlorophylle favorisant la remobilisation de nutriments dans des jeunes feuilles dont le vieillissement accélère en condition de stress vers d'autres organes en croissance (Munné-Bosch and Alegre, 2004). Pour mettre en perspective les résultats liés à l'expression de *HSP100* et de *RD22*, il aurait été intéressant de mesurer les contenus en chlorophylles afin d'avoir une idée de l'état des chloroplastes dans les génotypes étudiés.

Les gènes *SnRK1* et *SUSY* codent des enzymes impliquées dans le métabolisme du carbone. *SnRK1* est une protéine kinase impliquée dans la signalisation du métabolisme du carbone, elle est activée lorsque les niveaux en sucres de la cellule sont faibles et favorise la synthèse d'amidon (Lastdrager *et al.*, 2014). *SUSY* est une Saccharose Synthase, enzyme dégradant le saccharose. Dans nos conditions expérimentales, ces gènes ont tous les deux une tendance à la surexpression en condition de stress et de ré-irrigation chez les génotypes Kennebec (sensible) et Agria (résistante). Ces résultats sont en accord avec ceux de McKibbin *et al.*, (2006) qui montrent que ces deux gènes sont liés, la surexpression de *SnRK1* entraînant celle de cette *SUSY*. En revanche ils ne montrent pas de lien direct entre l'expression de *SUSY* et la dégradation du saccharose. Néanmoins, nous avons pu montrer pour le génotype Kennebec une faible corrélation entre l'expression de *SUSY* et la perte rendement qui n'est cependant pas liée uniquement à la potentielle diminution du saccharose. Notre étude portant sur des jeunes feuilles, il est possible que la dégradation du saccharose dans ces organes puisse augmenter l'import de saccharose depuis le phloème, moins disponible pour la synthèse d'amidon dans les tubercules, et participant à la perte de rendement.

## 5. Conclusion

L'analyse de l'ensemble de ces résultats montre que seul le gène *TAS14* est fortement surexprimé quelle que soit le génotype et donc qu'il pourrait être un bon candidat « marqueur » du stress hydrique. Aucun autre gène parmi ceux étudiés ne peut constituer un marqueur du stress hydrique commun aux 4 génotypes de l'essai. Deux marqueurs candidats spécifiques d'un génotype dont l'expression diminue en condition de déficit hydrique ont cependant été identifiés : *AREB1* pour Lady-Claire et *RD22* pour Jule. L'expression des autres gènes



semble fortement dépendante du génotype. Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, il s'agit de résultats préliminaires avec peu de répétitions, d'autres prélèvements ont été réalisés et seront analysés ultérieurement.

## 6. Perspectives

A court terme, pour approfondir les résultats obtenus dans cette étude, il serait nécessaire de refaire les mêmes analyses de qPCR avec plus de répétitions. Nous pourrions également continuer d'optimiser la qPCR en changeant la température de l'hybridation, pour qu'elle soit spécifique à chaque couple d'amorce. A moyen terme, on pourrait refaire les analyses de qPCR avec des gènes complémentaires plus spécifiques des réponses tardives ou d'acclimatation sur une plus longue durée plutôt que sur des gènes dont la transcription dépend de l'ABA et dont l'accumulation dans les feuilles est plutôt une réponse précoce (Zhang *et al.*, 2006). A plus long terme, d'autres approches sans *a priori* pourraient être réalisées telles que de la RNAseq.



## REFERENCES

- Aliche, E.B., Gengler, T., Hoendervangers, I., Oortwijn, M., Bachem, C.W.B., Borm, T., Visser, R.G.F. and Linden, C.G. van der** (2022) Transcriptomic Responses of Potato to Drought Stress. *Potato Res.*, **65**, 289–305.
- Aliche, E.B., Theeuwen, T.P.J.M., Oortwijn, M., Visser, R.G.F. and Linden, C.G. van der** (2020) Carbon partitioning mechanisms in POTATO under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **146**, 211–219.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373–399.
- Barra, M., Meneses, C., Riquelme, S., Pinto, M., Lagüe, M., Davidson, C. and Tai, H.H.** (2019) Transcriptome Profiles of Contrasting Potato (*Solanum tuberosum* L.) Genotypes Under Water Stress. *Agronomy*, **9**, 848.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C.** (1997) High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet*, **95**, 153–162.
- Bouaziz, D., Pirrello, J., Ben Amor, H., Hammami, A., Charfeddine, M., Dhibe, A., Bouzayen, M. and Gargouri-Bouzid, R.** (2012) Ectopic expression of dehydration responsive element binding proteins (StDREB2) confers higher tolerance to salt stress in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, **60**, 98–108.
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., et al.** (2015) Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells D. Weigel, ed. *eLife*, **4**, e03599.
- Burton, B.M. and Baker, T.A.** (2005) Remodeling protein complexes: Insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Science*, **14**, 1945–1954.
- Charfeddine, S., Charfeddine, M., Saïdi, M.N., Jbir, R. and Bouzid, R.G.** (2017) Potato dehydrins present high intrinsic disorder and are differentially expressed under ABA and abiotic stresses. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **128**, 423–435.
- Charkowski, A., Sharma, K., Parker, M.L., Secor, G.A. and Elphinstone, J.** (2020) Bacterial Diseases of Potato. In H. Campos and O. Ortiz, eds. *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*. Cham: Springer International Publishing, pp. 351–388. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_10) [Accessed March 2, 2023].
- Chen, X., Ding, Y., Yang, Y., Song, C., Wang, B., Yang, S., Guo, Y. and Gong, Z.** (2021) Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, **63**, 53–78.
- Chen, Y., Li, C., Yi, J., Yang, Y., Lei, C. and Gong, M.** (2020) Transcriptome Response to Drought, Rehydration and Re-Dehydration in Potato. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 159.

**CIP** Potato Processing and Uses. *International Potato Center*. Available at: <https://cipotato.org/potato/potato-processing-uses/> [Accessed March 1, 2023c].

**Cruz de Carvalho, M.H.** (2008) Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 156–165.

**Das, K. and Roychoudhury, A.** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, **2**. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053> [Accessed February 21, 2023].

**Devaux, A., Kromann, P. and Ortiz, O.** (2014) Potatoes for Sustainable Global Food Security. *Potato Res.*, **57**, 185–199.

**Doorenbos, J. and Kassam, A.H.** (1979) Yield response to water. *Yield response to water*. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19796730583> [Accessed February 20, 2023].

**Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., et al.** (2008) Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxygenated Carotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiology*, **147**, 1984–1993.

**FAO FAOSTAT.** Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#home> [Accessed February 7, 2023a].

**Fidler, J., Graska, J., Gietler, M., Nykiel, M., Prabucka, B., Rybarczyk-Płońska, A., Muszyńska, E., Morkunas, I. and Labudda, M.** (2022) PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Abscisic-Acid-Dependent Responses of Plants to External or Internal Stimuli. *Cells*, **11**, 1352.

**Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Le Hingrat, Y., Alabouvette, C. and Steinberg, C.** (2012) Potato soil-borne diseases. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, **32**, 93–132.

**Galek, R., Rurek, M., De Jong, W.S., Pietkiewicz, G., Augustyniak, H. and Sawicka-Sienkiewicz, E.** (2011) Application of DNA markers linked to the potato H1 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of Globodera rostochiensis. *J Appl Genet*, **52**, 407–411.

**Gangadhar, B.H., Sajeesh, K., Venkatesh, J., Baskar, V., Abhinandan, K., Yu, J.W., Prasad, R. and Mishra, R.K.** (2016) Enhanced Tolerance of Transgenic Potato Plants Over-Expressing Non-specific Lipid Transfer Protein-1 (StnsLTP1) against Multiple Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, **7**. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01228> [Accessed January 31, 2023].

**Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., et al.** (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 8023–8028.

- George, T.S., Taylor, M.A., Dodd, I.C. and White, P.J.** (2017) Climate Change and Consequences for Potato Production: a Review of Tolerance to Emerging Abiotic Stress. *Potato Res.*, **60**, 239–268.
- Gorgues, L., Li, X., Maurel, C., Martinière, A. and Nacry, P.** (2022) Root osmotic sensing from local perception to systemic responses. *Stress Biology*, **2**, 36.
- Hanana, M., Deluc, L., Fouquet, R., Daldoul, S., Léon, C., Barrieu, F., Ghorbel, A., Mliki, A. and Hamdi, S.** (2008) Identification et caractérisation d'un gène de réponse à la déshydratation « rd22 » chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 569–578.
- Hane, D.C. and Hamm, P.B.** (1999) Effects of Seedborne Potato Virus Y Infection in Two Potato Cultivars Expressing Mild Disease Symptoms. *Plant Disease*, **83**, 43–45.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S. and Masmoudi, K.** (2011) Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 1503–1509.
- Harshavardhan, V.T., Van Son, L., Seiler, C., et al.** (2014) AtRD22 and AtUSPL1, members of the plant-specific BURP domain family involved in *Arabidopsis thaliana* drought tolerance. *PLoS One*, **9**, e110065.
- Hayashi, M., Inoue, S., Takahashi, K. and Kinoshita, T.** (2011) Immunohistochemical Detection of Blue Light-Induced Phosphorylation of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Stomatal Guard Cells. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 1238–1248.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F. and Munné-Bosch, S.** (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, **14**, 125–132.
- Hill, D., Nelson, D., Hammond, J. and Bell, L.** (2021) Morphophysiology of Potato (*Solanum tuberosum*) in Response to Drought Stress: Paving the Way Forward. *Frontiers in Plant Science*, **11**. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.597554> [Accessed April 19, 2022].
- Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A. and Munns, R.** (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1503–1514.
- Hörtensteiner, S.** (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends in Plant Science*, **14**, 155–162.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., et al.** (2003) The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 5549–5554.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z. and Gong, Z.** (2012) A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHR1, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **24**, 2546–2561.
- Huamán, Z.** (1980) *Systematic Botany and Morphology of the Potato*, International Potato Center.

**IPCC** IPCC Expert Meeting Report – Towards New Scenarios for Analysis of Emissions, Climate Change, Impacts, and Response Strategies — IPCC. Available at: <https://www.ipcc.ch/publication/ipcc-expert-meeting-report-towards-new-scenarios-for-analysis-of-emissions-climate-change-impacts-and-response-strategies/> [Accessed February 20, 2023b].

**Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., et al.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **27**, 325–333.

**Kundu, S. and Gantait, S.** (2017) Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response. *Plant Gene*, **11**, 61–69.

**Lastdrager, J., Hanson, J. and Smeekens, S.** (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 799–807.

**Lee, U., Rioflorido, I., Hong, S.-W., Larkindale, J., Waters, E.R. and Vierling, E.** (2007) The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *The Plant Journal*, **49**, 115–127.

**Lutaladio, N. and Castaldi, L.** (2009) Potato: The hidden treasure. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 491–493.

**Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. and Grill, E.** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*, **324**, 1064–1068.

**Martin, R.L., Boulch, P.L., Clin, P., Schwarzenberg, A., Yvin, J.-C., Andrivon, D., Nguema-Ona, E. and Val, F.** (2020) A comparison of PTI defense profiles induced in *Solanum tuberosum* by PAMP and non-PAMP elicitors shows distinct, elicitor-specific responses. *PLOS ONE*, **15**, e0236633.

**Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., et al. eds.** (2021) Summary for policymakers. In *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, pp. 3–32.

**Mekonen, S., Alemu, T., Kassa, B. and Forbes, G.** (2011) Evaluation of contact fungicide spray regimes for control of late blight (*Phytophthora infestans*) in southern Ethiopia using potato cultivars with different levels of host resistance. *Trop. plant pathol.*, **36**, 21–27.

**Mekonen, S. and Tadesse, T.** (2018) Effect of Varieties and Fungicides on Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*, (Mont.) de Bary) Management. *Agrotechnology*, **07**. Available at: <https://www.omicsonline.org/open-access/effect-of-varieties-and-fungicides-on-potato-late-blight-phytophthora-infestans-mont-de-bary-management-2168-9881-1000182-105594.html> [Accessed December 14, 2022].

**Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B.H., Okal, E.J., Lei, Z., Saqib, H.S.A., Yuan, W., Xu, W. and Zhang, Q.** (2022) Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *Int J Mol Sci*, **23**, 1084.

- Muijen, D. van, Anithakumari, A. m., Maliepaard, C., Visser, R.G.F. and Linden, C.G. van der** (2016) Systems genetics reveals key genetic elements of drought induced gene regulation in diploid potato. *Plant, Cell & Environment*, **39**, 1895–1908.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M. and Gibon, Y.** (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1715–1729.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L.** (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biol.*, **31**, 203–216.
- Musse, M., Hajjar, G., Ali, N., et al.** (2021) A global non-invasive methodology for the phenotyping of potato under water deficit conditions using imaging, physiological and molecular tools. *Plant Methods*, **17**, 81.
- Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L. and Evers, D.** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2907–2914.
- Obidiegwu, J., Bryan, G., Jones, H. and Prashar, A.** (2015) Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in Plant Science*, **6**. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00542> [Accessed April 22, 2022].
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., et al.** (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, **324**, 1068–1071.
- Pavlista, A.** (1995) EC95-1249 Potato Production Stages: Scheduling Key Practices. *Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension*. Available at: <https://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1584>.
- Peixoto, B. and Baena-González, E.** (2022) Management of plant central metabolism by SnRK1 protein kinases. *J Exp Bot*, **73**, 7068–7082.
- Raymundo, R., Asseng, S., Robertson, R., Petsakos, A., Hoogenboom, G., Quiroz, R., Hareau, G. and Wolf, J.** (2018) Climate change impact on global potato production. *European Journal of Agronomy*, **100**, 87–98.
- Renault, D. and Wallender, W.W.** (2000) Nutritional water productivity and diets. *Agricultural Water Management*, **45**, 275–296.
- Riahi, K., Rao, S., Krey, V., Cho, C., Chirkov, V., Fischer, G., Kindermann, G., Nakicenovic, N. and Rafaj, P.** (2011) RCP 8.5—A scenario of comparatively high greenhouse gas emissions. *Climatic Change*, **109**, 33.
- Rorat, T.** (2006) Plant dehydrins — Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **11**, 536–556.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006) Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor,

DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, **18**, 1292–1309.

**Saubeau, G., Gaillard, F., Legentil, L., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V., Andrivon, D. and Val, F.** (2014) Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of Phytophthora infestans Efficient against Pectobacterium atrosepticum. *Molecules*, **19**, 15374–15390.

**Saubeau, G., Perrin, F., Marnet, N., Andrivon, D. and Val, F.** (2016) Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to Phytophthora infestans. *Plant Pathology*, **65**, 342–352.

**Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., et al.** (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell*, **119**, 9–18.

**Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B.** (2019) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, **24**, 2452.

**Soma, F., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2021) Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems. *Plants*, **10**, 756.

**Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2018) A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*, **556**, 235–238.

**Thiele, G., Theisen, K., Bonierbale, M. and Walker, T.** (2010) Targeting the poor and hungry with potato science. *Potato Journal*, **37**, 75–86.

**Thomas, C., Boulch, P.L., Andrivon, D. and Val, F.** (2019) Potato genotypes differentially alter the expression of Phytophthora infestans effectors during PAMP-mediated resistance induction. , 547984. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/547984v1> [Accessed February 10, 2023].

**Thomas, H. and Smart, C.M.** (1993) Crops that stay green. *Ann Applied Biology*, **123**, 193–219.

**Toreti A., Bavera D., Acosta Navarro, et al.** (2022) Drought Reports - Global Drought Observatory - JRC European Commission. Available at: <https://edo.jrc.ec.europa.eu/gdo/php/index.php?id=2050> [Accessed November 24, 2022].

**Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11632–11637.

**Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**, research0034.1.

- Vinichuk, M., Bergman, R., Sundell-Bergman, S. and Rosén, K.** (2021) Response of spring wheat and potato to foliar application of Zn, Mn and EDTA fertilizers on  $^{137}\text{Cs}$  uptake. *Journal of Environmental Radioactivity*, **227**, 106466.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., et al.** (2017) Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, **8**. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00161> [Accessed January 19, 2023].
- Weber, H., Chételat, A., Reymond, P. and Farmer, E.E.** (2004) Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**, 877–888.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. and Shinozaki, K.** (1992) Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant and Cell Physiology*, **33**, 217–224.
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K. and Sugimoto, Y.** (2008) Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 786–793.
- Yin, Y., Adachi, Y., Ye, W., Hayashi, M., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Mori, I.C. and Murata, Y.** (2013) Difference in Abscisic Acid Perception Mechanisms between Closure Induction and Opening Inhibition of Stomata. *Plant Physiology*, **163**, 600–610.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, **61**, 672–685.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J. and Ismail, A.M.** (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, **97**, 111–119.
- Zhu, J.-K.** (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, **167**, 313–324.

## ANNEXES

### Annexe I : Calculs réalisés par geNorm

Pour chaque combinaison de deux gènes de référence  $k$  et  $l$ , le logiciel calcule une matrice  $A_{kl}$  de  $m$  éléments correspondant au ratio des expressions de gène  $QR_{ik} / QR_{il}$  de chaque échantillon  $i$  transformé par le logarithme de base 2 (Equation 3).

$$A_{kl} = \left\{ \log_2 \frac{QR_{ik}}{QR_{il}} \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (3)$$

Les variations deux à deux  $V_{kl}$  entre les gènes  $k$  et  $l$  sont définies comme l'écart-type des éléments de  $A_{kl}$ . Pour discriminer quels gènes de ménage ne peuvent être utilisés pour la normalisation de l'expression des gènes cibles, un coefficient  $M_k$  est calculé et correspond à la moyenne arithmétique des variations deux à deux  $V_{kl}$  (Equation 4).

$$M_k = \frac{\sum_{l=1}^n V_{kl}}{n-1} \quad (4)$$

Ainsi, les calculs sont itérés plusieurs fois et à chaque itération, le gène de référence candidat dont le coefficient de variation  $M_k$  est le plus élevé est retiré jusqu'à ce que des valeurs de  $M_k$  inférieures à 1,5 soient calculées. En parallèle, lorsque les valeurs de  $M_k$  sont inférieures à 1,5, geNorm calcule un coefficient de normalisation  $NF_i$  pour chaque échantillon  $i$ . Ce facteur de normalisation correspond au ratio entre la moyenne géométrique par échantillon  $GM_i$  de l'expression des gènes de ménage sélectionnés  $QRq$  et la moyenne géométrique de l'ensemble des  $GM_i$  ( $GMM_i$ ) (Equations 5 à 7).

$$GM_i = \left( \prod_{i=1}^q QR_i \right)^{\frac{1}{q}} = \sqrt[q]{QR_1 QR_2 \dots QR_q} \quad (5)$$

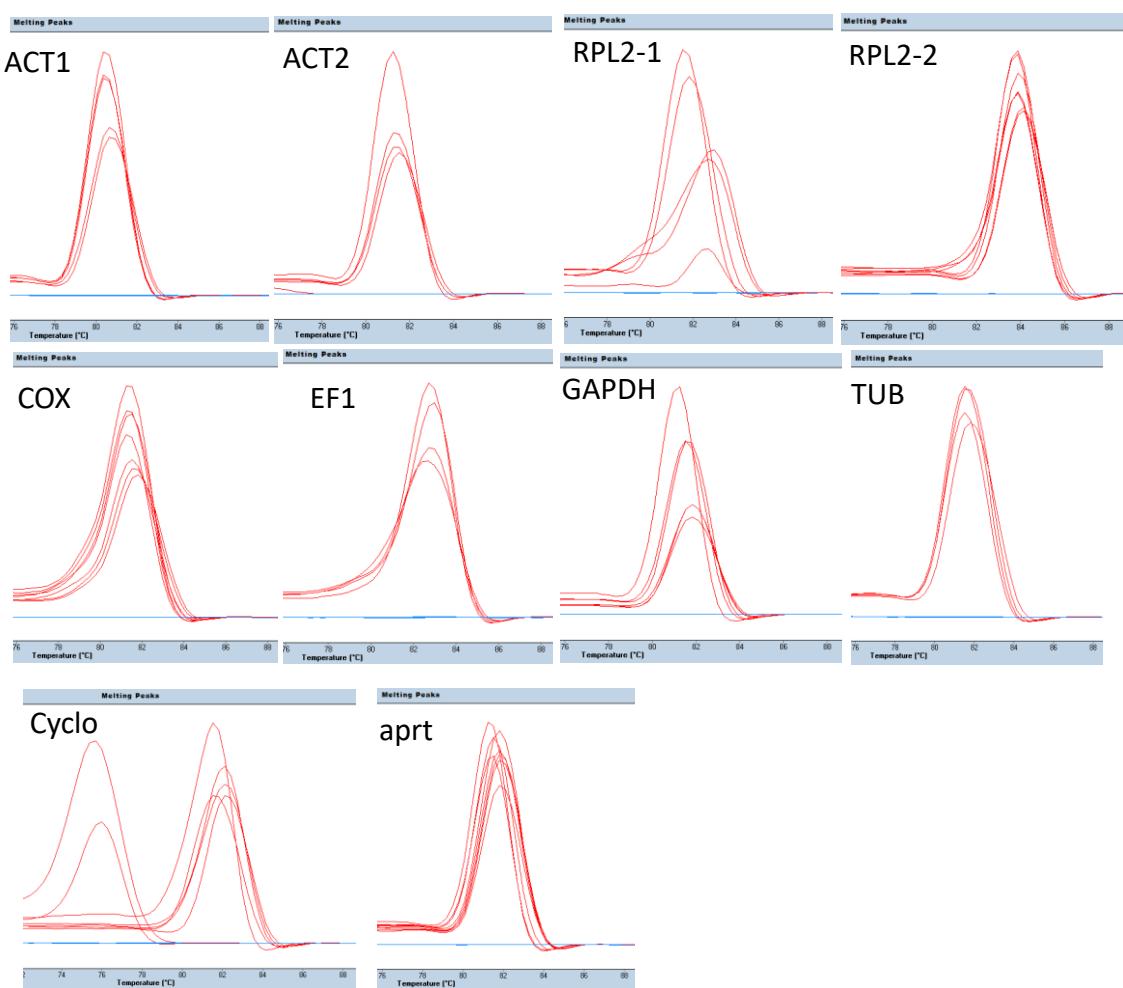
$$GMM_i = \left( \prod_{i=1}^q GM_i \right)^{\frac{1}{q}} = \sqrt[q]{GM_1 GM_2 \dots GM_q} \quad (6)$$

$$NF_i = \frac{GM_i}{GMM_i} \quad (7)$$

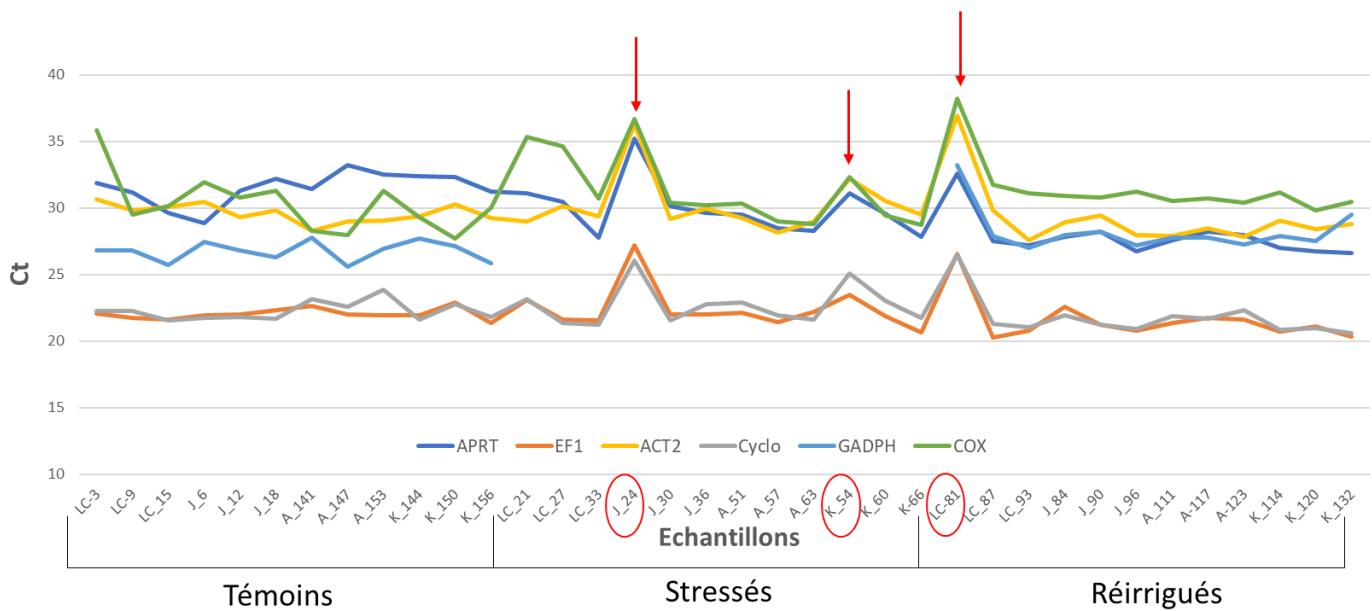
La quantification relative normalisée ( $QRN_{ij}$ ) d'un gène cible  $j$  pour un échantillon  $i$  correspond alors au ratio entre la quantité relative  $QR_{ij}$  du gène  $j$  dans l'échantillon et au facteur de normalisation calculé pour chaque échantillon  $NF_i$  (Equation 8).

$$QRN_{ij} = \frac{QR_{ij}}{NF_i} \quad (8)$$

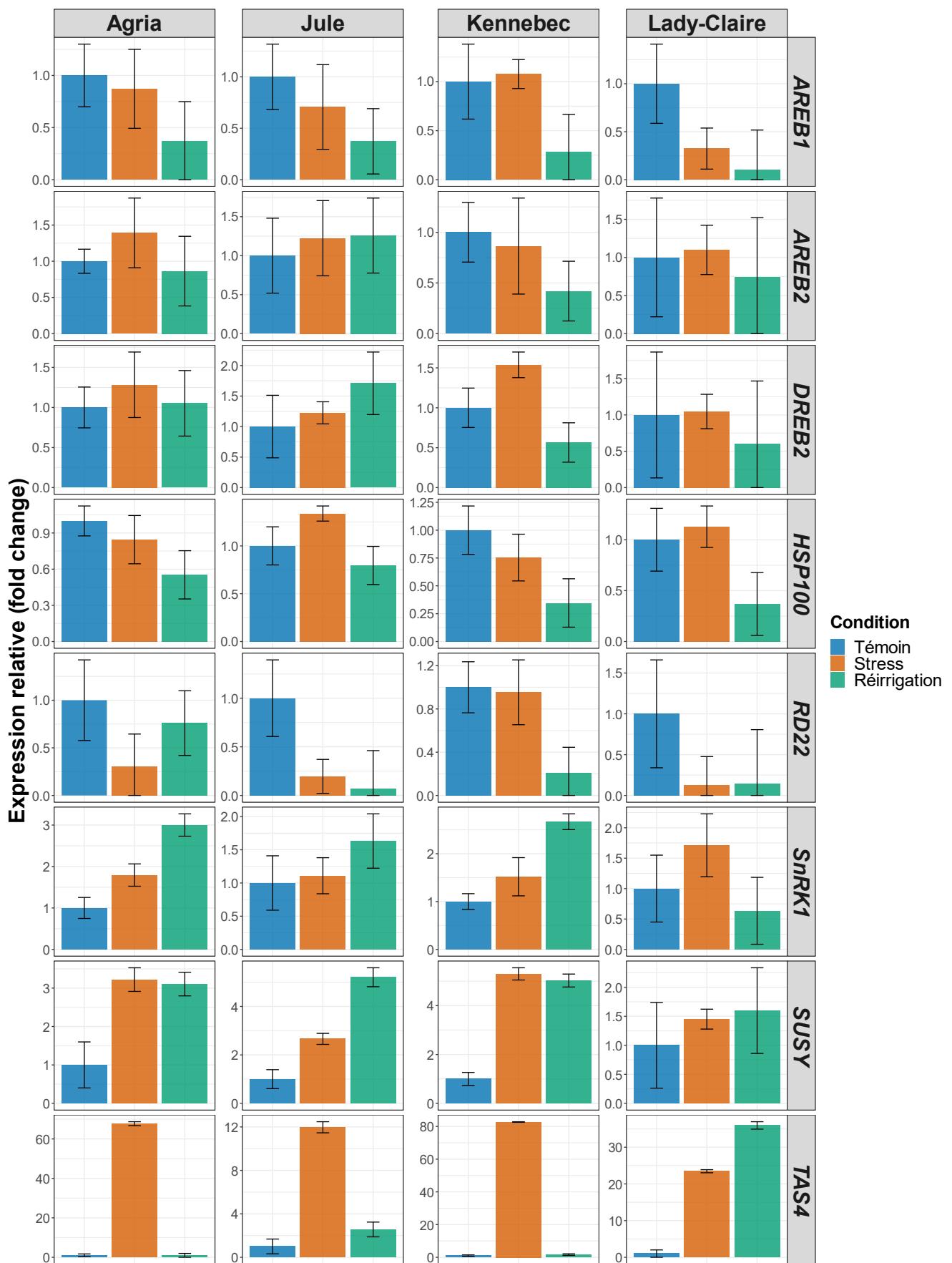
## Annexe IIa : Pics de fusion des gènes de référence, testés sur les échantillons IS3



## Annexe IIb : Courbes des Ct des gènes de « référence par échantillon



**Annexe III : Ratios de l'expression relative des gènes par rapport à la condition témoin.**



			Diplôme: Master Mention : Biologie Végétale (BV) Parcours : Gestion de la Santé des Plantes (GSP)			
Auteur : Jonas PETARD			Organisme d'accueil : IGEPP			
Date de naissance : 02/10/1999			Adresse : Domaine de la Motte BP 35327 35653 Le Rheu cedex			
Nb pages : 21 ; Annexes : 3			Maître de stage : Florence VAL			
Année de soutenance : 2023	<b>Titre français :</b> Etude de l'effet d'un déficit hydrique sur les réponses moléculaires de <i>S. tuberosum</i> <b>Titre anglais :</b> Study of a water deficit on molecular responses in <i>Solanum tuberosum</i> .					
<b>Résumé :</b>						
Dans un contexte de réchauffement climatique, les sécheresses de plus en plus fréquentes et intenses entraînent des pertes de rendement sur les cultures d'importance agronomique comme celle de la pomme de terre ( <i>S. tuberosum</i> ). Pour ces cultures, un des enjeux scientifiques majeur est le développement de génotypes plus tolérants au stress hydrique. Pour y répondre, il est important de mieux comprendre les impacts d'un déficit hydrique sur la plante, y compris à l'échelle moléculaire. L'objectif de cette étude est donc d'identifier des candidats marqueurs moléculaires du stress hydrique communs à 4 génotypes de pomme de terre tolérant différemment le stress hydrique. L'expression de 8 gènes connus pour être impliqués dans la réponse à ce stress a été analysée par qPCR à partir de folioles de génotypes cultivés en condition d'irrigation optimale, de déficit hydrique ou de ré-irrigation. Le rendement en tubercules a été évalué en cours et en fin d'expérimentation.						
Cette étude a montré que (i) les gènes ne sont pas exprimés différemment chez tous les génotypes dans les trois conditions (ii) quand ils sont exprimés différemment, leur expression est fortement dépendante du génotype (iii) le gène <i>TAS14</i> pourrait être un bon candidat et (iv) aucune corrélation spécifique n'a été mise en évidence entre expression des gènes et rendement. Ces résultats restent préliminaires et la recherche de marqueurs universels servant d'outils de sélection pourrait être poursuivie par une étude RNAseq sans <i>a priori</i> .						
<b>Abstract:</b>						
In a context of global warming, more and more frequent and intense drought events lead to yield losses on important agronomic crops as potato crop ( <i>S. tuberosum</i> ). For these crops, a major scientific issue is to develop more tolerant to drought genotypes. To answer to that, it is important to better understand the impacts of a water deficit, including at a molecular level. The aim of this study is thus to identify candidate molecular markers of water stress common to 4 potato genotypes that tolerate water stress differently. The expression of 8 genes known for their implication in this stress was analysed by qPCR from leaflets of genotypes grown in optimal irrigation, water deficit or re-watering conditions. Tuber yield has been evaluated during the experimentation and at the end of the experimentation.						
This study showed that (i) genes are not expressed differentially in all the genotypes in the three condition (ii) when they are expressed differentially, their expression is strongly genotype dependant (iii) <i>TAS14</i> may be a good candidate and (iv) no specific correlation was put in evidence between gene expression and yield. These results remain preleminary and research for universal markers as selection tools might be followed by a RNAseq study without <i>a priori</i> .						
<b>Mots-clés :</b> pomme de terre, stress hydrique, ABA, qPCR						
<b>Key Words:</b> potato, water stress, ABA, qPCR						