



HAL
open science

Sollicitations mécaniques et transport de l'information à longue distance chez les plantes

Erwan Tinturier

► **To cite this version:**

Erwan Tinturier. Sollicitations mécaniques et transport de l'information à longue distance chez les plantes. [Stage] France. Université Clermont Auvergne (UCA), FRA.; France. Institut d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Alimentation, Santé Animale, Sciences Agronomiques et de l'Environnement (VetAgro Sup), FRA. 2018, 33 p. hal-02788867

HAL Id: hal-02788867

<https://hal.inrae.fr/hal-02788867>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MASTER II Biologie Végétale « Plant Integrative Biology and Breeding »

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR:

Erwan Tinturier



SUJET:

Sollicitations mécaniques et transport de l'information à longue distance chez les plantes

Responsable du Stage: **Jean-Louis Julien**



Juin 2018

« Une plante est un chant dont le rythme déploie une forme certaine, et dans l'espace expose un mystère du temps. »

Paul Valéry

Remerciements

Ce stage a été réalisé dans le laboratoire de Physique et physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant, unité mixte de recherche entre l'INRA et l'Université Clermont Auvergne, à Clermont-Ferrand.

En premier lieu, je tiens à remercier Jean-Louis Julien pour m'avoir permis d'effectuer ce stage de fin d'étude. Grâce à lui, et notamment à travers nos discussions, j'ai pu découvrir et mieux appréhender l'électrophysiologie. La confiance qu'il m'a accordée m'a permis de conduire mon stage avec une grande autonomie et liberté d'action, je l'en remercie.

Je tiens à remercier Eric Badel pour son implication dans les expérimentations, pour ces enseignements en mécanique, et pour la correction de ce rapport.

J'adresse un grand merci aux techniciens qui m'ont accompagné durant toute la période de ce stage : Romain pour avoir comblé quelques unes de mes lacunes en électronique, et pour m'avoir aidé à mettre en place le dispositif de mesure d'électrophysiologie ; Brigitte pour avoir assuré la culture des peupliers dont j'avais besoin, il y en a eu assez. Stéphane pour m'avoir supporté dans cette cohabitation qu'a été le labo MECA de Crouel durant ces quelques mois, c'était chouette !

Mes derniers remerciements vont à l'équipe MECA et à l'ensemble du PIAF. En particulier Nicole pour m'avoir accordé ses conseils en cytologie ; Jérôme pour ces moments de travail intense partagés au bureau de l'université ; Benjamin pour m'avoir donné du temps sans compter à m'enseigner les arcanes de MatLab®.

Résumé

Les plantes sont constamment soumises à de multiples contraintes mécaniques générées par le vent ou le toucher. Elles répondent à ces stimuli en modifiant leur croissance. Cette réponse de croissance mécano-induite peut se produire rapidement et à longue distance du site initial de stimulation, impliquant l'existence d'un signal transportant l'information à travers la plante. La nature de ce signal est encore inconnue. Il a été mis en évidence la génération et la propagation d'un signal électrique chez le peuplier lorsque sa tige est fléchie. Pour cela, nous avons développé un dispositif de mesures électrophysiologiques extra cellulaires couplé à un banc de flexion à amplitude contrôlée. De par sa forme et son déplacement bidirectionnel dans la tige, ce signal électrique ressemble à un potentiel d'action. Cependant, un point le distingue du potentiel d'action : un mode de propagation non auto-entretenu ; démontré par la capacité du signal à se régénérer après avoir traversé une section de tige privé de cellules excitables. Cela amène à postuler que le signal électrique soit généré par une onde de pression hydraulique induite par la flexion de la tige selon une théorie en cours de développement dans la littérature.

Mots clés : Flexion, signal électrique, signal hydraulique, mécano-sensible, thigmomorphogenèse, peuplier.

Abstract

Plants daily undergo external mechanical solicitations such as wind or touch and respond to these stimuli by adjusting their growth processes. A fascinating feature of this mechanical-induced growth response is that it can occur rapidly and at long distance from the initial site of stimulation; suggesting the existence of a fast signal that propagates across the whole plant. The nature and the origin of the signal are still not understood. An experimental device was developed to record electrophysiological extracellular signal on poplar trees during controlled stem bending. Our results show that the bending of stem generates an electrical signal that propagates through the plant. Some characteristics of this electrical signal such as its shape and its bidirectional displacement in the stem are similar to the characteristics of an action potential. However, one point distinguishes this signal from the action potential: a non-self-propagating mode of propagation; demonstrated by the ability of the signal to propagate through a stem segment without bark. This leads us to suggest that the electrical signal is generated by an hydraulic pressure wave induced by the bending of the stem as described by a theory being developed in the literature.

Key words: Bending, electrical signal, hydraulic signal, mechanosensing, thigmomorphogenesis, poplar.

Liste des abréviations

ARN : acide ribonucléique

ATPase : adénosinetriphosphatase

CO₂ : dioxyde de carbone

CPMCW : Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall

ϵ : déformation longitudinale

F : force maximale appliquée à la poutre

h : hauteur de la poutre

Hz : Hertz

MCA : Mid1 Complementing Activity

MscS : Mechanosensitive channel of Small conductance

MscS-like : Mechanosensitive channel of Small conductance – like

MSL : Mechanosensitive channel of Small conductance – like

mV : milli Volt

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OL : onde lente

Ω : Ohm

ρ : rayon du gabarit

r : rayon de la tige

ROS : Reactive Oxygen Species

PA : potentiel d'action

Peptide RGD : peptide au motif arginine-glycine-asparagine

PI : protéinase inhibitor

PIAF : Physique et physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant

PVC : polyvinyl chloride

σ : contrainte

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 2 |
| I. NATURE DES SOLLECITATIONS MECANIQUES | 2 |
| 1. <i>Signaux internes</i> | 2 |
| 2. <i>Signaux externes</i> | 2 |
| II. MECANOPERCEPTION | 3 |
| 1. <i>La variable mécanique perçue par la plante</i> | 3 |
| 2. <i>Mécanismes de perception du signal mécanique</i> | 4 |
| III. REPONSES PHYSIOLOGIQUES AUX SOLLECITATIONS MECANIQUES | 5 |
| 1. <i>Modification de la croissance radiale</i> | 5 |
| 2. <i>Modification de la croissance longitudinale</i> | 6 |
| IV. LE TRANSFERT A LONGUE DISTANCE DE L'INFORMATION | 6 |
| 1. <i>Signal chimique</i> | 6 |
| 2. <i>Signaux hydrauliques</i> | 7 |
| V. LES SIGNAUX ELECTRIQUES | 9 |
| 1. <i>Potentiel de membrane des cellules végétales au repos</i> | 9 |
| 2. <i>Deux signaux majeurs chez les plantes</i> | 10 |
| VI. OBJECTIF DE STAGE..... | 12 |
| MATERIELS ET METHODES | 13 |
| I. LE MATERIEL VEGETAL ET LES CONDITIONS DE CULTURES..... | 13 |
| II. PREPARATION DES PLANTES POUR LA FLEXION : | 13 |
| III. LES DIFFERENTES STIMULATIONS..... | 13 |
| 1. <i>La stimulation lésante : la brûlure</i> | 13 |
| 2. <i>La stimulation non lésante : la flexion</i> | 13 |
| IV. TECHNIQUE DE MESURE DES POTENTIELS ELECTRIQUES EXTRACELLULAIRES | 14 |
| 1. <i>Les électrodes</i> | 14 |
| 2. <i>Appareillages électroniques</i> | 14 |
| 3. <i>Protocole expérimental</i> | 15 |
| V. TRAITEMENT DES DONNEES | 15 |
| VI. CYTOLOGIE | 15 |
| RESULTATS | 16 |
| I. IDENTIFICATION DU SIGNAL DE TOUCHER AVANT FLEXION | 16 |
| II. VARIATION DE POTENTIEL APRES UNE BRULURE DE FEUILLE | 16 |
| III. ELECTRODE DE MESURES ELOIGNEES DE LA ZONE DE FLEXION DANS LE CAS D'UNE FLEXION BASALE DE LA TIGE | 16 |
| IV. ELECTRODE DE MESURES PROCHES DE LA ZONE DE FLEXION DANS LE CAS D'UNE FLEXION BASALE DE LA TIGE | 17 |
| V. VARIATION DE POTENTIEL SUITE A UNE FLEXION DE TIGE EN POSITION APICALE | 17 |
| VI. INFLUENCE DU CONTACT TIGE-GABARIT SUR LA VARIATION DE POTENTIEL GENEREE PAR LA FLEXION | 17 |
| VII. VARIATION DE POTENTIEL SUITE A UNE FLEXION SUR UNE TIGE DECORTIQUEE (SANS PHLOEME) | 18 |
| DISCUSSION..... | 18 |
| I. INTERPRETATION DU SENS DES VARIATIONS DE POTENTIELS MESUREES | 18 |
| II. SIGNAL D'HYPERPOLARISATION APRES UNE FLEXION BASALE DE LA TIGE AVEC DES ELECTRODES ELOIGNEES DE LA STIMULATION | 19 |
| 1. <i>Validité du dispositif de mesure électrophysiologique</i> | 20 |
| 2. <i>L'hyperpolarisation dans la bibliographie</i> | 20 |
| 3. <i>Signal perçu par l'électrode de référence</i> | 20 |
| III. CARACTERISATION DU SIGNAL DE DEPOLARISATION APRES FLEXION..... | 21 |
| 1. <i>Influence du contact tige-gabarit sur le signal de dépolarisation</i> | 21 |
| 2. <i>Comparaison avec le potentiel d'action</i> | 21 |
| IV. MODE DE PROPAGATION DU SIGNAL DE DEPOLARISATION APRES FLEXION | 22 |
| 1. <i>Hypothèse d'une propagation par le xylème : similarité avec l'onde lente</i> | 22 |
| 2. <i>La « Squeeze Cell Hypothesis »</i> | 23 |
| 3. <i>Application de la Squeeze Cell Hypothesis dans un cas de flexion</i> | 23 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 24 |

Introduction

Les plantes terrestres sont des organismes fixés, presque immobiles. Elles se développent dans la verticalité tout en étendant des ramifications toujours plus petites tant dans l'espace aérien que souterrain. Dans l'espace aérien elles captent le rayonnement solaire et le CO₂, et sous terre, elles puisent des éléments minéraux et de l'eau, ainsi elles satisfont leur besoin énergétique. Cette surface d'échange peut atteindre, pour un arbre moyen, jusqu'à 200 hectares (Hallé 2004). De telles architectures sont susceptibles de se maintenir en croissance durant des siècles dans un environnement fluctuant et contraignant les soumettant en permanence à des stimuli, notamment ceux de nature mécanique. Les recherches scientifiques ont pu montrer que les arbres étaient capables d'adapter de façon continue l'ancrage de leurs racines, la croissance de leurs branches et de leur tronc à l'intensité des perturbations mécaniques qu'ils subissent dans leur milieu de vie (Mouliat *et al.* 2006, Telewski 2006).

L'ensemble des réponses apportées par les plantes à ces sollicitations mécaniques est appelé « thigmomorphogenèse ». De manière intéressante, ces réponses peuvent prendre place dans la zone sollicitée mécaniquement mais également à distance de celle-ci, impliquant l'existence d'un signal transportant l'information à travers la plante. Les origines et la nature de ce signal sont encore très mal connues et sujettes à controverses depuis de nombreuses années.

Parmi les hypothèses proposées, une première propose qu'un signal de nature hydraulique dont l'origine est purement physique soit responsable du transfert d'information rapide à travers de la plante. Des études récentes, menées par le laboratoire PIAF à Clermont-Ferrand, ont mis en évidence la formation et la propagation d'un tel signal hydraulique à travers la tige lorsque celle-ci est fléchie (Lopez *et al.* 2014).

Une seconde hypothèse propose qu'un signal de nature électrique soit responsable du transfert d'information rapide dans la plante après une sollicitation mécanique. Ce signal électrique serait alors généré par la flexion elle-même ou par l'onde de pression hydraulique générée par la flexion (Julien 1993, Stahlberg *et al.* 2005, Farmer *et al.* 2014).

L'objectif des recherches exposées ici est d'étayer cette hypothèse de signal électrique qui serait généré et transporté lors de la flexion de tige. En vue de répondre à cet objectif un dispositif de mesures électrophysiologiques extra cellulaires couplé à un banc de flexion à amplitude contrôlée sera développé.

Synthèse bibliographique

I. Nature des sollicitations mécaniques

Deux types de contraintes mécaniques peuvent être distingués : les contraintes mécaniques internes à la plante, inhérentes à sa structure et à sa croissance, et les perturbations mécaniques externes provenant de l'environnement.

1. Signaux internes

Les sollicitations mécaniques internes auxquelles la plante est soumise seront décrites en commençant de l'échelle cellulaire jusqu'à celle de l'individu.

A l'échelle de la cellule la pression de turgescence exerce une contrainte mécanique homogène sur la paroi pecto-cellulosique et constitue le moteur de la croissance cellulaire (Schopfer 2006). A cette contrainte, la paroi oppose une résistance à la déformation, qui n'est pas homogène et dépend de l'arrangement des microfibrilles de cellulose, ce qui pilote ainsi l'orientation de la croissance de la cellule (Schopfer 2006). Une baisse de la turgescence, par exemple dans des conditions de sécheresse, entraîne parfois la perte de la résistance mécanique des tissus végétaux, provoquant leur flétrissement (Telewski 2006).

La croissance et la différenciation d'une cellule sont affectées par l'état mécanique des cellules avoisinantes. Ces contraintes internes entre les cellules sont nommées auto-contraintes, et sont notamment dues à une croissance différentielle au sein d'un organe ou d'un tissu.

A l'échelle tissulaire, lors des processus de réorientation des axes, il se forme un bois de réaction qui génère les contraintes mécaniques nécessaire à la courbure. On peut aussi noter que l'auto-chargement induit par le port de fruits peut influencer la croissance des branches (Almeras *et al.* 2004).

Le même phénomène est retrouvé à l'échelle de l'arbre entier où l'augmentation de la biomasse aérienne au cours de la vie d'un individu, conjuguée à l'effet de la gravité, impose des contraintes au sein des tissus de la plante et contribuent à moduler la structure générale de celle-ci (Telewski 2006).

2. Signaux externes

La plante est capable de percevoir de nombreuses sollicitations mécaniques externes. Certains stimuli sont induits par la gravité comme l'accumulation de glace ou de neige. D'autres sollicitations mécaniques sont induites par le toucher, comme par exemple l'impact des gouttes de pluies, la grêle, des objets inanimés, ou, au contraire, les interventions humaines ou animales. Le vent est l'une des sollicitations mécaniques externes les plus

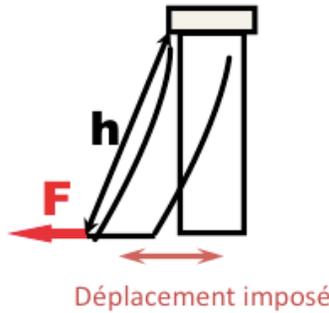
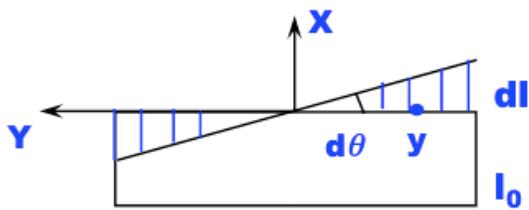


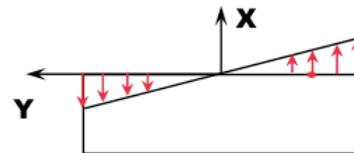
Figure 1 : Poutre encastree d'une hauteur h , soumise à un chargement ou force maximale, notée F . Le moment fléchissant est le produit de la hauteur h et de la force maximale F .

Déformation longitudinale



$$\varepsilon_{(y, s, h)} = dl/l_0 = y * C_{(s, h)}$$

Contrainte longitudinale



$$\sigma_{(y, s, h)} = \varepsilon_{(y, s, h)} * E_{LL}$$

E_{LL} : module d'Young
(rigidité élastique)

Figure 2 : La déformation longitudinale (ε) et la contrainte (σ) sont des variables mécaniques locales.

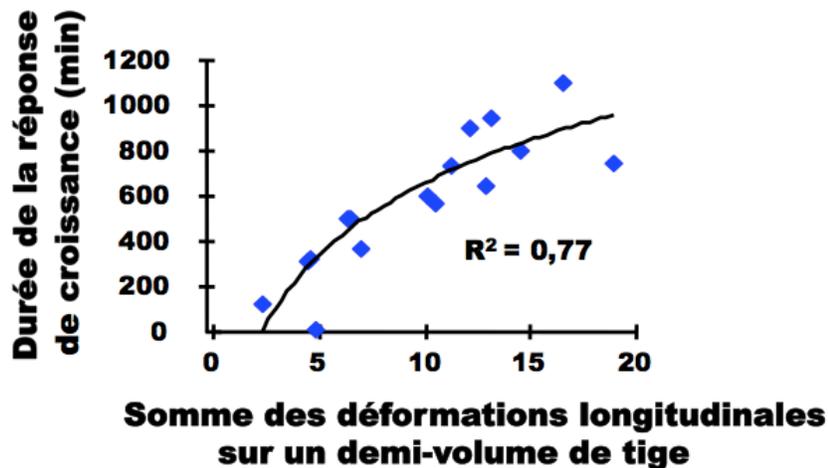


Figure 3 : Corrélation entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations longitudinales appliquées du demi volume de la tige (Coutand et Moulia 2000).

courantes, qui induit des flexions ou des torsions de certains organes des plantes (Coutand 2010).

Les blessures causées par des herbivores ou des piqûres d'insectes sont bien souvent envisagées dans la littérature comme des sollicitations mécaniques externes de type lésant. Une brûlure n'est pas considérée comme une sollicitation mécanique. Cependant c'est un stimulus utilisé par de nombreux auteurs, et dont les réponses sont semblables à celles déclenchées par des sollicitations mécaniques lésantes.

Ces sollicitations mécaniques sont collectivement nommées aussi thigmo-stimuli et produisent nombres de réponses thigmomorphogénétiques chez les plantes (Braam 2004).

Par la suite, nous ne traiterons que les effets des sollicitations mécaniques externes sur les plantes. Après avoir décrits les différentes sollicitations mécaniques auxquelles les plantes peuvent être confrontées, nous nous interrogerons sur la manière dont les plantes perçoivent ces sollicitations.

II. Mécanoperception

1. La variable mécanique perçue par la plante

Des travaux récents associant physique et biologie ont cherché à identifier la variable mécanique perçue par les plantes. Pour cela, on considère la tige d'une plante comme une poutre dont l'extrémité est soumise à un chargement mimant le vent ou une flexion. Un ensemble de grandeurs mécaniques globales s'applique ainsi à la poutre qui est soumise à la force maximale, notée F , générant moment fléchissant qui est le produit de la hauteur de la poutre (h) par la force maximale (figure 1) et un déplacement, appelé flèche. Différentes variables mécaniques locales (figure 2) peuvent être définies telles que la déformation longitudinale (ε) et la contrainte (σ) laquelle est le produit de la déformation par le module de Young (qui caractérise la rigidité du matériau considéré).

En étudiant la réponse de croissance à une flexion transitoire contrôlée de tige chez la tomate (figure 3), il a été mis en évidence une corrélation entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations longitudinales appliquées (Coutand et Moulia 2000). Aucune autre corrélation n'a été mise en évidence avec les autres variables mécaniques décrites précédemment, suggérant que la variable mécanique perçue par la plante est bien la déformation subie par les tissus.

L'identification de la variable mécanique perçue par la plante a constitué une étape importante dans la compréhension de la réponse des plantes aux stimuli mécaniques car il est aujourd'hui possible d'envisager une étude quantitative du phénomène de mécanoperception.

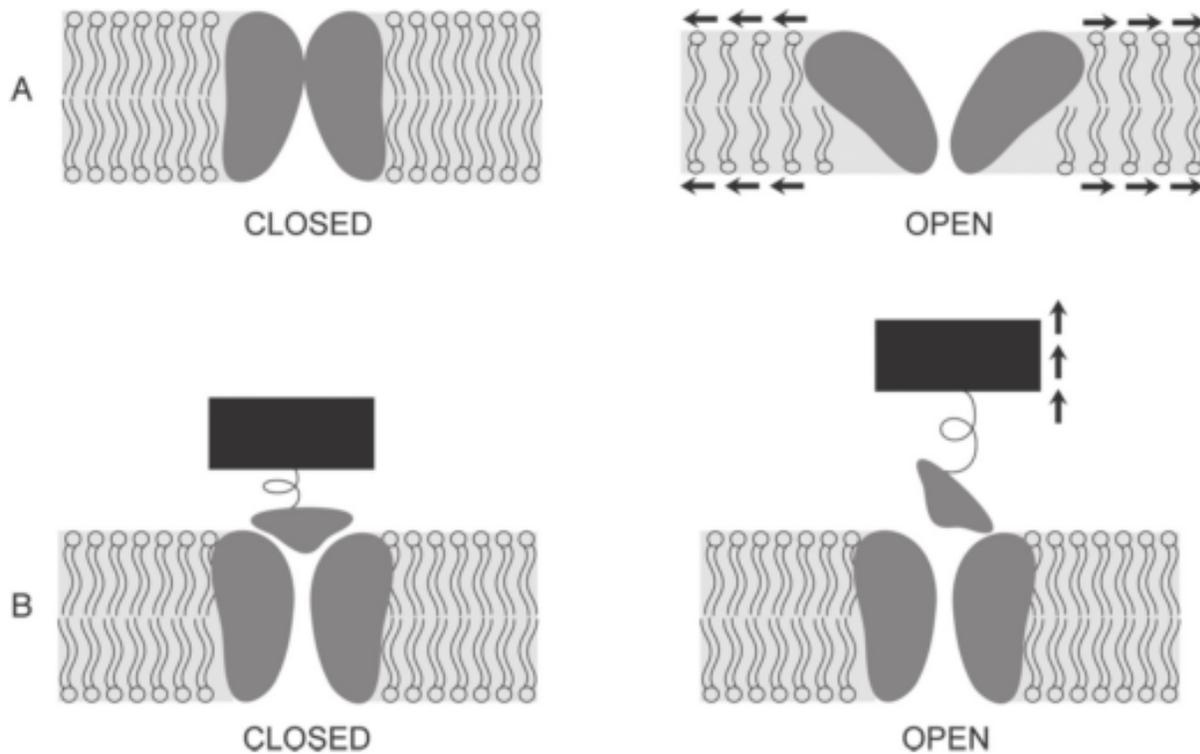


Figure 4 : Deux mécanismes proposés pour l'ouverture des canaux mécanosensibles. (A) L'état ouvert du canal (permettant le passage des ions à travers la membrane) est favorisé par une augmentation de la tension de la membrane plasmique qui change la force qu'elle exerce sur l'interface protéine-lipide. (B), l'état ouvert du canal est favorisé par l'ouverture d'une « trappe » reliée par un composant élastique au cytosquelette ou à la paroi pecto-cellulosique (Monshausen *et al.* 2013).

2. Mécanismes de perception du signal mécanique

Les structures cellulaires capables de percevoir les déformations et les acteurs moléculaires sous-jacents qui conduisent à des réponses générales physiologiques de la plante sont toujours sous intenses investigations. Dans les prochaines sections, il sera présenté l'état des connaissances actuelles sur ce sujet.

a. *Le continuum CPMCW (Cytosqueleton – Plasma Membrane – Cell Wall)*

La perception d'une sollicitation mécanique par les cellules est un processus rapide nécessitant une conversion rapide du signal mécanique en signal biologique. En 2002, Jaffe et ses collaborateurs proposent un modèle de mécano-perception pour les plantes, inspiré du modèle animal, dans lequel divers éléments du cytosquelette (microtubules, filament d'actine), la membrane plasmique et la paroi pecto-cellulosique seraient liés *via* des peptides particuliers, et formeraient une continuité structurale nommée CPMCW pour *Cytosqueleton-Plasma-Membrane-Cell Wall*. Dans ce réseau de mécano-perception, les peptides RGD (motif arg-gly-asp) similaires aux intégrines feraient le lien entre les microtubules et la membrane plasmique (Jaffe *et al.* 2002). Les formines feraient le lien entre les filaments d'actine et la paroi pecto-cellulosique (Yi *et al.* 2005).

b. *Les canaux mécanosensibles*

Parmi les mécanismes impliqués dans la mécano-perception, de nombreuses études ont été réalisées sur les canaux mécano-sensibles. Les canaux mécano-sensibles sont des canaux ioniques dans lesquels l'état « ouvert » est favorisé en présence d'une charge mécanique, déclenchant une sortie ou une entrée d'ions dans le cytosol, transformant, en quelque sorte, le signal mécanique en flux d'ions cellulaires (Monshausen et Haswell 2013). La famille MscS (Mechanosensitive channel of Small conductance), identifiée d'abord chez *Escherichia Coli*, a servi de système modèle dans l'étude des structures des canaux mécano-sensibles, de leurs propriétés biochimiques et de leurs rôles physiologiques (Haswell *et al.* 2011). Par la suite, des gènes codant pour des protéines MscS-Like ont été identifiés dans de multiples génomes de plantes, dont en particulier 10 gènes *MSL* chez *Arabidopsis thaliana*. Il existe deux modèles décrivant le déclenchement de l'ouverture de ces canaux (Figure 4). Plusieurs études illustrent le caractère ubiquitaire des canaux mécano-sensibles chez les plantes, et soulignent également l'existence de canaux non sélectifs et d'autres sélectifs aux ions Ca^{2+} , Cl^- , K^+ (Monshausen et Haswell 2013). La famille MCA (Mid1 Complementing Activity) présente notamment deux protéines MCA1 et MCA2 identifiées comme des canaux Ca^{2+} dont les mécanismes d'ouverture sont encore indéterminés (Iida *et al.* 2014).

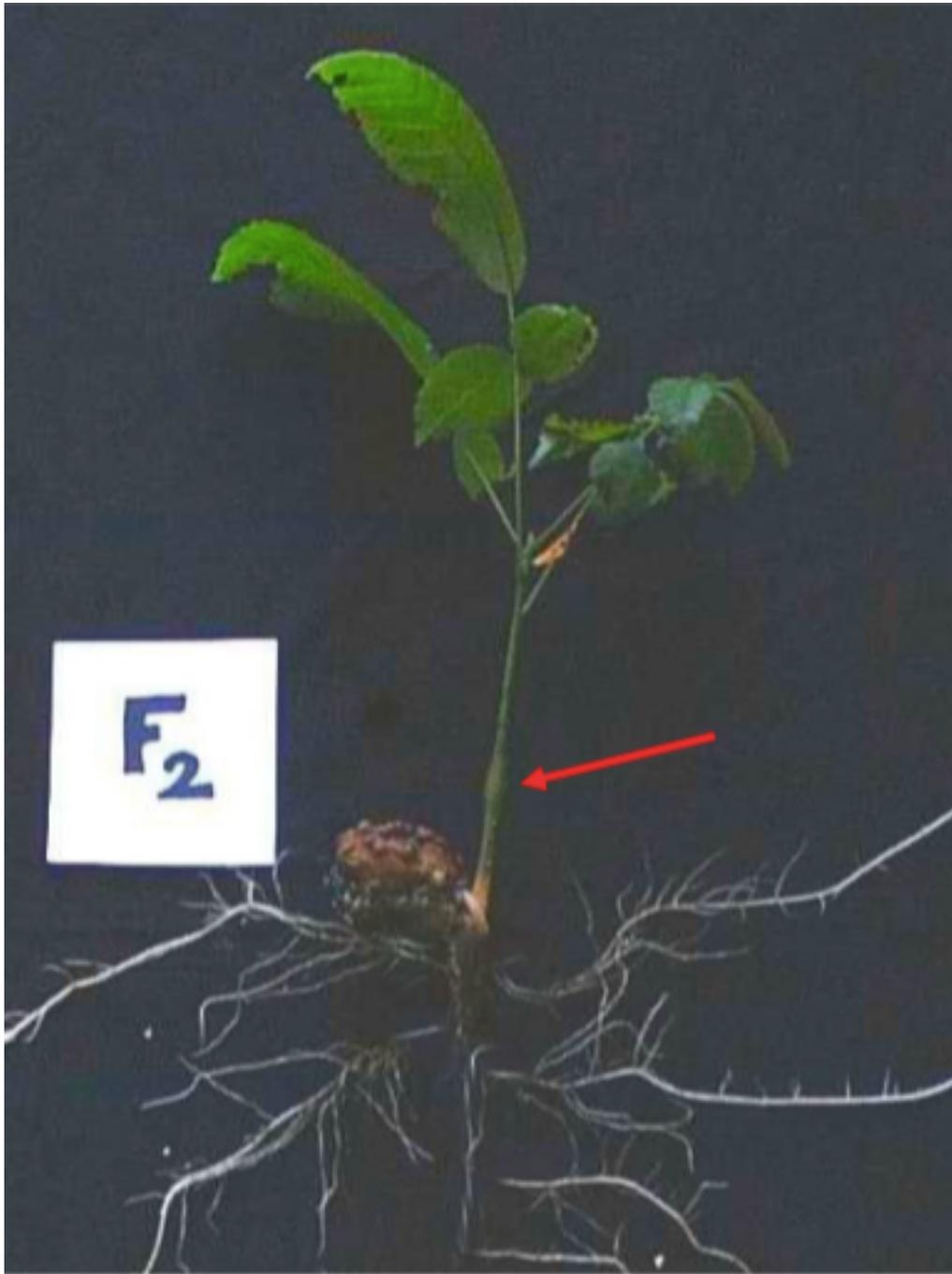


Figure 5 : Effet de flexions répétées sur la croissance radiale d'un jeune noyer. Les noyers âgés de 3 semaines ont été soumis à une flexion bidirectionnelle par jour pendant une semaine. Une augmentation localisée du diamètre des plantes est visible à la base de la zone sollicitée (flèche rouge) (Crouzet 2002).

Les plantes sont donc capables de percevoir les sollicitations mécaniques externes auxquelles elles peuvent être exposées. Voyons maintenant quelles sont les réponses engendrées par cette perception.

III. Réponses physiologiques aux sollicitations mécaniques

Les réponses morphologiques, biochimiques et physiologiques des plantes suites à des sollicitations mécaniques constituent ce qui est connu sous le nom de thigmomorphogenèse (Jaffe 1973, 1980). Nous verrons que ces réponses peuvent être « locales », c'est-à-dire au niveau de la région sollicitée, mais aussi « distale », éloignée de cette dernière.

1. Modification de la croissance radiale

La modification de la croissance radiale des tiges des plantes est une conséquence « locale » des sollicitations mécaniques externes.

Dès 1803, Knight (d'après revue de Telewski 2006) observe que les pommiers protégés du vent ont une croissance radiale plus faible que ceux qui y sont exposés. Chez le peuplier, une augmentation significative de la croissance radiale suite à des flexions est observée (Pruyn *et al.* 2000, Tixier *et al.* 2014). Ces résultats sont retrouvés (figure 5) chez de jeunes noyers (*Juglans regia*) après multiples flexions (Crouzet 2002, Leblanc-Fournier *et al.* 2008).

Il semblerait donc que les ligneux, d'après la plupart des travaux, montrent une réponse locale commune de croissance radiale.

a. Modification des caractéristiques mécaniques des tissus

La modification de la croissance radiale des tiges peut s'accompagner d'une modification des caractéristiques mécaniques des tissus (Pruyn *et al.* 2000, Kern *et al.* 2005).

Le module de Young caractérise la rigidité d'un matériau, ici du bois. Chez le peuplier, une diminution significative du module de Young, après flexion, a été mesurée (Pruyn *et al.* 2000, Kern *et al.* 2005). Cela s'explique par un changement dans l'anatomie du nouveau bois formé qui possède des vaisseaux en plus faible nombre et de plus faible diamètre (Kern *et al.* 2005), ce nouveau bois formé serait donc moins rigide.

Parallèlement, la rigidité de flexion, qui exprime la rigidité d'une tige, tend à augmenter chez les ligneux soumis à des perturbations mécaniques comme le montre Telewski (1989) chez le sapin (*Abies fraseri*).

En résumé, l'évolution de ces paramètres sur des arbres subissant des perturbations mécaniques, traduit les changements de l'anatomie des tiges dans le nouveau bois mis en place au cours d'une croissance radiale amplifiée.

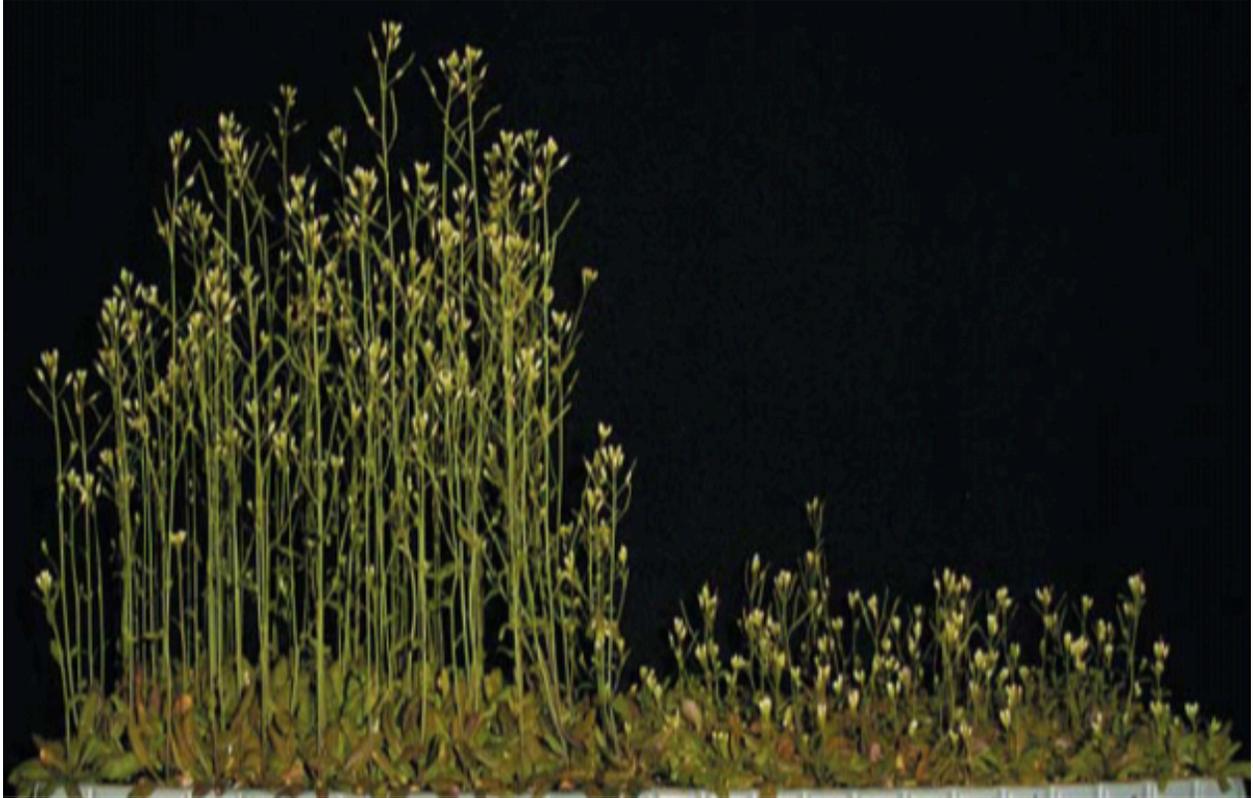


Figure 6 : Effet de touchers répétés sur la croissance longitudinale des hampes florales d'*A. thaliana*. Les plantes touchées deux fois par jour pendant plusieurs jours (à droite) présentent des hampes florales dont la croissance longitudinale a été fortement diminuée par rapport aux plantes non sollicitées (à gauche) (Braam, 2004).

2. Modification de la croissance longitudinale

De nombreux résultats d'expérimentations menées en conditions naturelles montrent que la croissance longitudinale est augmentée chez les plantes protégées du vent, c'est le cas chez *Larix laricina* (Larson 1965), *Prunus avium* (Coutand *et al.* 2008), chez l'herbacée *Medicago sativa* (Mouliia et Combes 2004). Ces résultats montrent l'effet du vent en terme de signal mécanique sur la croissance longitudinale des plantes.

Différents travaux étudient l'effet de diverses sollicitations mécaniques artificielles sur la croissance longitudinale. Ainsi, la croissance longitudinale est diminuée suite à des frottements chez *Phaseolus vulgaris* (Erner et Jaffe 1983), par brossage chez *Abies fraseri* (Telewski et Jaffe 1986), après deux touchers par jour chez *Arabidopsis thaliana* (figure 6, Braam 2004) et après flexion chez *Lycopersicon esculentum* (Depege *et al.* 1997, Coutand *et al.* 2000) et sur *Juglans regia* (Leblanc-Fournier *et al.* 2008).

La variation de la croissance longitudinale suite à des sollicitations mécaniques apparaît être une réponse commune chez de nombreuses espèces. Toutefois il a été mis en évidence que cette réponse de croissance longitudinale présente à une variabilité intraspécifique (Pruyn *et al.* 2000, Coutand *et al.* 2000). Et même dans certains cas, par exemple chez le peuplier, il n'est pas observé de réponse suite à une seule flexion de tige (Tixier *et al.* 2014).

IV. Le transfert à longue distance de l'information

Nous avons vu qu'une plante répond à une perturbation mécanique de manière sensible à la fois localement et à distance. Alors que la réponse locale a été fortement étudiée et que sa compréhension devient plus précise, la réponse à distance n'est toujours pas élucidée et demeure un domaine actif de recherche (Mouliia *et al.* 2011). L'idée qu'un signal soit généré au niveau de la zone déformée et qu'il se propage à travers la plante jusqu'à la zone qui régule la croissance primaire est acceptée. L'illustration d'un transfert rapide à longue distance est faite sur la tomate par Coutand et collaborateurs (2000) : une flexion appliquée sur un entre-nœud, dont la croissance longitudinale est terminée, entraîne un arrêt de croissance en longueur de la tige au bout de 5 minutes (figure 7). Cependant, la nature du signal reste inconnue.

1. Signal chimique

Une première hypothèse présentée dans la littérature suggère que ce signal serait issu de la production de substances chimiques au niveau de la zone fléchie, qui seraient ensuite transportées par le phloème jusqu'à l'apex. Durant longtemps cette hypothèse a été privilégiée car un certain nombre d'hormones de signalisation ont été identifiées chez les plantes (Neel et

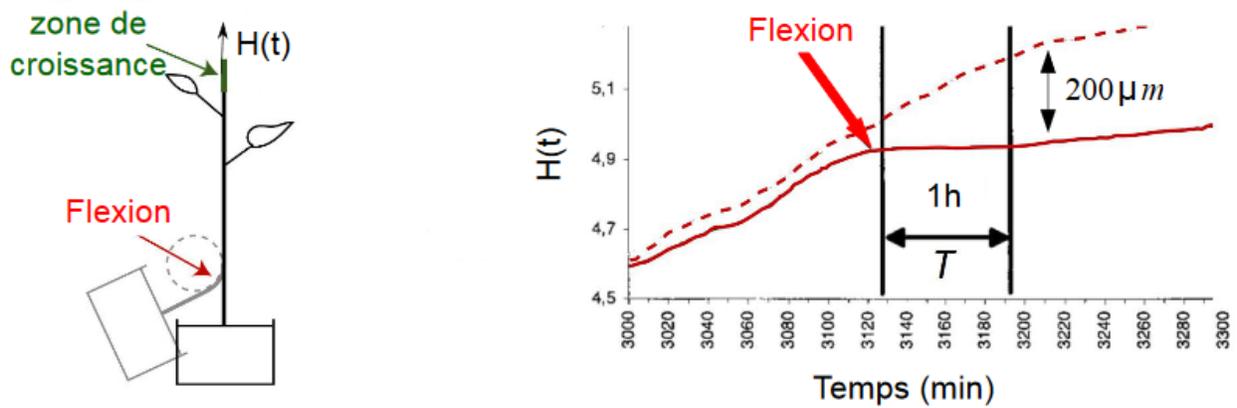


Figure 7 : Evolution temporelle de la croissance en réponse à une flexion transitoire appliquée à la base de la tige (flèche rouge), loin de la zone de croissance (vert). Quelques minutes après le stimulus, la croissance s'arrête pendant un temps T . La ligne en pointillé montre la croissance d'un individu témoin non perturbé. Adaptée de Coutand *et al.*, 2000.

Harris 1971). Cependant, cette hypothèse se heurte à un problème dans le cas d'un arrêt de croissance primaire rapide induit par flexion, en effet la vitesse d'ascension de la sève est de l'ordre du mm.s^{-1} et ne tiendrait pas compte du temps de réponse à l'échelle moléculaire.

2. Signaux hydrauliques

Des sollicitations mécaniques sont susceptibles de déclencher des signaux hydrauliques dans différentes plantes. Ces signaux hydrauliques entraînent deux composantes mobiles distinguées par Malone (1996) : l'onde de pression et la dispersion hydraulique ou mass flow.

a. L'onde de pression hydraulique

L'onde de pression hydraulique consiste en un changement de pression se propageant dans le continuum vasculaire que forme le xylème. Le front de l'onde serait susceptible de se mouvoir à la vitesse du son dans l'eau soit 1500m.s^{-1} (Malone 1996). Cependant pour être pertinent physiologiquement, l'onde de pression doit causer un changement significatif dans la pression de turgescence des cellules vivantes qui la perçoivent (Malone 1996).

Les plantes peuvent être extrêmement sensibles au changement de pression. Raschke (1970) montre que des petits changements de pression (appliqués par pincement) dans les feuilles de maïs ont un effet rapide sur l'ouverture des stomates. Malone et Stankovic (1991) mesurent un signal systémique de nature hydraulique en réponse à une blessure localisée. Ils montrent que la blessure cause un important et rapide changement de pression dans les cellules épidermiques à travers toutes les feuilles du plant de blé. La vitesse de déplacement de ce signal hydraulique est estimée supérieure à 10 cm.s^{-1} par Boari et Malone (1993). Malone (1993) suggère que la réduction immédiate du taux de transpiration suite à une blessure localisée observée à plusieurs reprises, (Sambeek et Pickard 1976, Wildon *et al.* 1992), pourrait être due à une fermeture hydropassive des stomates due au passage de l'onde de pression hydraulique.

Pour Malone (1993), dans des conditions venteuses, la distorsion transitoire d'une tige imposerait des changements locaux et rapides de la pression du xylème susceptibles de se propager à travers le xylème comme une onde de pression hydraulique. Cependant, il suppose que ces « ondulations » de pression transitoires seraient confinées au xylème et n'auraient donc que des conséquences physiologiques minimales, le xylème mature étant un tissu mort. En revanche, lorsque le changement de pression locale du xylème est soutenu par la capacité hydraulique d'un tissu transmetteur, ou par la perte continue d'eau des cellules voisines, alors la pression dans tout le xylème et la pression de turgescence de toutes les cellules de la tige seront affectées. Et cela pourrait avoir des conséquences physiologiques majeures.

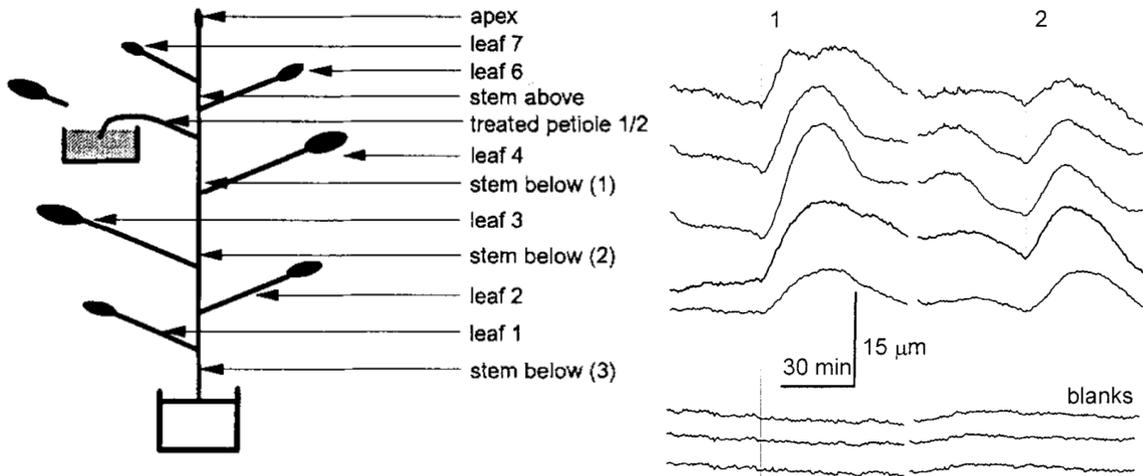


Figure 8 : Passage d'un signal hydraulique à travers des pétioles de feuilles de tomates (*Lycopersicon esculentum*) après application d'une brûlure. La mesure d'épaisseur de feuille provenant de 5 plantes différentes est montrée. Au temps indiqué par la première ligne verticale, une foliole de la feuille 2 a été brûlée. L'enregistrement est coupé durant 3h, puis une seconde foliole de la feuille 2 a été brûlée. La variation d'épaisseur des pétioles est mesurée à l'aide d'un transducteur Sangamo (Sangamo Transducers, Bognor Regis, Sussex, UK). (Malone et Alarcon 1994).

Contrairement à Malone, Moulia (2011) suspecte que les changements transitoires du flux d'eau dans le système de circulation de la sève, suite à une flexion mécanique, puissent être le vecteur de l'information à longue distance déclenchant des réponses thigmomorphogénétiques dans les zones de croissances primaires. En 2014, Lopez et ses collaborateurs mesurent une variation transitoire de pression hydraulique, dans une branche de peuplier suite à une flexion, qui se propage rapidement à travers l'ensemble de la tige.

b. Le « mass flow » xylémien ou « dispersion hydraulique »

La dispersion hydraulique se réfère à la transmission d'un signal chimique par « mass flow » dans le xylème (Malone 1996). Le xylème étant largement dépourvu de membranes transversales, il offre une distribution potentiellement rapide de molécules organiques (éthylène, protéines) (Neumann 2007) et inorganiques (Ca^{2+}) (Canny 1993) sur de longues distances.

Ricca (1916) suspecte qu'un tel phénomène survienne autour de sites de blessures chez *Mimosa pudica*, et qu'il soit le vecteur d'information à longue distance déclenchant le repliement progressif des feuilles de la sensitive. D'après Malone (1996) ce phénomène est bien susceptible de se développer au niveau d'une blessure chez *Mimosa pudica*. Il explique que l'eau provenant des cellules blessées est relâchée dans l'apoplaste, si le xylème est sous tension, il attirera cette eau et la tension locale du xylème sera soulagée. Le soulagement local de la tension du xylème se propagera rapidement ($15\text{-}30 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) dans tout le xylème (Malone *et al.* 1994).

Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), des dommages infligés à une feuille provoquent sur d'autres feuilles une accumulation rapide d'inhibiteurs de protéases (PI) (Green et Ryan 1973, Graham *et al.* 1986). Ces PI sont toxiques pour les insectes, et font partie intégrante de la réponse de défense systémique induit par une blessure (Alarcon et Malone 1994). Ces auteurs étudient la nature du signal longue distance impliqué dans la réponse PI. Ils montrent qu'une brûlure sur une foliole de tomate produit un mass flow (figure 8) se dispersant sur une distance allant de 270 mm à 2700 mm et ayant un sens de propagation aussi bien basipète qu'acropète. Ce phénomène de dispersion hydraulique requiert donc un xylème sous tension et lorsque le plant de tomate est bien hydraté et maintenu à haute humidité, la transpiration est alors minimale et la dispersion hydraulique n'est plus observée. Sous ces conditions, l'accumulation de PI sur des sites éloignés de la blessure est empêchée. Ces résultats sont en faveur d'une signalisation par dispersion hydraulique suite à une sollicitation mécanique lésante.



Figure 9 : *Dionaea muscipula*. Photos by PurebloodRose, PhD;
<https://purebloodrose.deviantart.com/art/Dionaea-muscipula-and-drosera-rotundifolia-382112645>



Figure 10 : *Mimosa pudica*. (a) Les folioles des feuilles sont en position ouvertes. (b) Suite à une stimulation au toucher, les folioles des feuilles se replient. Photos by Barry Rice, PhD; <http://www.sarracenia.com/galleria/galleria.html>.

V. Les signaux électriques

Burdon-Sanderson (1872) est le premier à mesurer un signal électrique de type potentiel d'action (PA) chez les plantes en stimulant une feuille de Vénus attrape-mouche (*Dionaea muscipula*) (figure 9). Il apparaît alors que l'activité électrique n'appartient pas au seul monde animal. Le PA est par la suite observé à de multiples reprises sur d'autres espèces comme *Nitella* et *Mimosa pudica* (figure 10) (Umrath 1930, Sibaoka 1953). En 1935, Houwink découvre un autre type de signal électrique, l'onde lente (OL) suite à des brûlures infligées à *Mimosa pudica*. Des revues exhaustives sont publiées par Sibaoka en 1969 et par Barbara Pickard en 1973, indiquant que toutes les plantes pourraient utiliser les signaux électriques pour réguler une grande variété de fonctions physiologiques.

1. Potentiel de membrane des cellules végétales au repos

Les cellules végétales présentent une distribution inégale des ions diffusibles (K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Na^+) de part et d'autre de la membrane plasmique résultant de différents mécanismes (figure 11). Cette différence de potentiel électrique est nommée potentiel de membrane ou potentiel transmembranaire. Le potentiel transmembranaire est mis en évidence en introduisant des électrodes de mesure de part et d'autre de la membrane plasmique : la face interne de la membrane est négative par rapport à l'électrode de référence placée sur la face externe de la membrane. Dans des conditions de repos, le potentiel transmembranaire est stable, il est nommé potentiel de repos et a une valeur caractéristique d'environ -160 mV (cellules végétales).

Parmi les différents mécanismes permettant cette différence de potentiel, il est distingué ceux qui ne sont pas directement dépendant du métabolisme cellulaire (diffusion passive des ions à travers la membrane) et qui correspondent à la composante passive du potentiel de membrane; et ceux dépendant du métabolisme cellulaire (pompes électrogènes, systèmes redox du plasmalemm) et qui constituent la composante active du potentiel de repos.

a. Composante passive

La membrane biologique constitue une barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule. Elle présente la propriété de perméabilité sélective, qui permet de contrôler l'entrée et la sortie des différentes molécules et ions entre le milieu extra et intracellulaire. La composante passive, résultant de la diffusion des ions à travers la membrane, se nomme aussi potentiel de diffusion. L'état de repos est principalement déterminé par la perméabilité de la membrane au K^+ . Le potentiel de diffusion de la membrane suit alors la relation de Nernst pour des concentrations élevées en potassium extracellulaire.

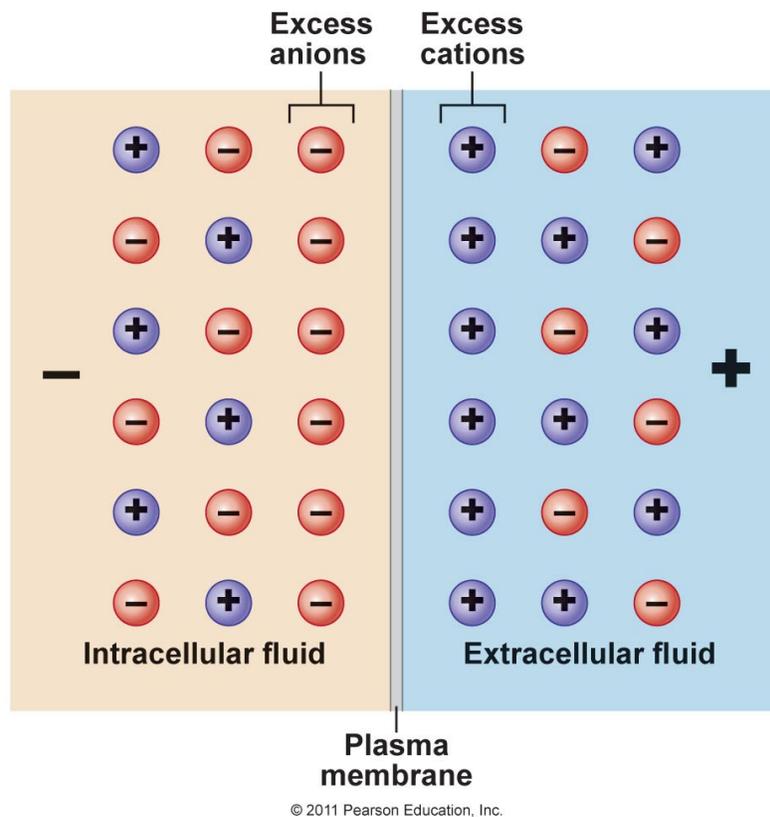


Figure 11 : Le potentiel de membrane résulte d'une distribution inégale des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. En milieu intracellulaire, les anions sont en excès. En milieu extracellulaire, les cations sont en excès (Pearson Education 2011).

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C^+]_1}{[C^+]_2}$$

où E représente la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane, R est la constante des gaz parfaits, T la température, n est la valence de l'ion, F le Faraday et C^+ représente la concentration du cation. L'équation de Goldman permet d'obtenir une valeur plus précise du potentiel de diffusion en prenant en considération l'ensemble des ions diffusant à travers la membrane.

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_H[H^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_H[H^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}$$

Où P représente le coefficient de perméabilité de l'ion indiqué en indice et $[K^+]$, $[Na^+]$, $[H^+]$, et $[Cl^-]$ les concentrations respectives du K^+ , Na^+ , H^+ et du Cl^- , dans le milieu extracellulaire (indice e) et intracellulaire (indice i).

Le potentiel de diffusion ne rend pas compte à lui seul de la différence de potentiel membranaire, en 1965, Slayman met en évidence la composante active du potentiel transmembranaire.

b. Composante active

Ce sont avec les travaux de Slayman (1965) qui mettent en évidence la présence d'une pompe à H^+ à activité électrogène située dans la membrane plasmique. Par la suite, Spanwick (1981) confirme l'existence d'une pompe à H^+ électrogène chez *Nitella*. Puis Marré et Ballarin-Denti (1985) montrent que l'utilisation de la fusicoccine, un activateur de la pompe à H^+ (Marre 1979), entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Ces résultats seront par la suite confirmés chez *Egeria densa* (Dahse *et al.* 1988) et sur la racine de moutarde blanche (Felle 1987). Enfin, le rôle de l'activité H^+ -ATPase dans le maintien du potentiel transmembranaire semble maintenant certain (Kurkdjian et Guern 1989).

En plus de la pompe à H^+ , un système rédox transmembranaire évacuant des protons hors de la cellule en utilisant du NAD(P)H a été décrit. Cependant, ce système contribue très modestement à la polarisation de la membrane.

Ainsi, l'activité de la pompe H^+ -ATPase de la membrane plasmique peut être considérée comme la composante active du potentiel de repos.

2. Deux signaux majeurs chez les plantes

a. Le potentiel d'action

Le PA correspond, à l'échelle de la cellule, à une dépolarisation rapide et transitoire (moins d'une minute avant retour au potentiel de repos) de la membrane plasmique (figure

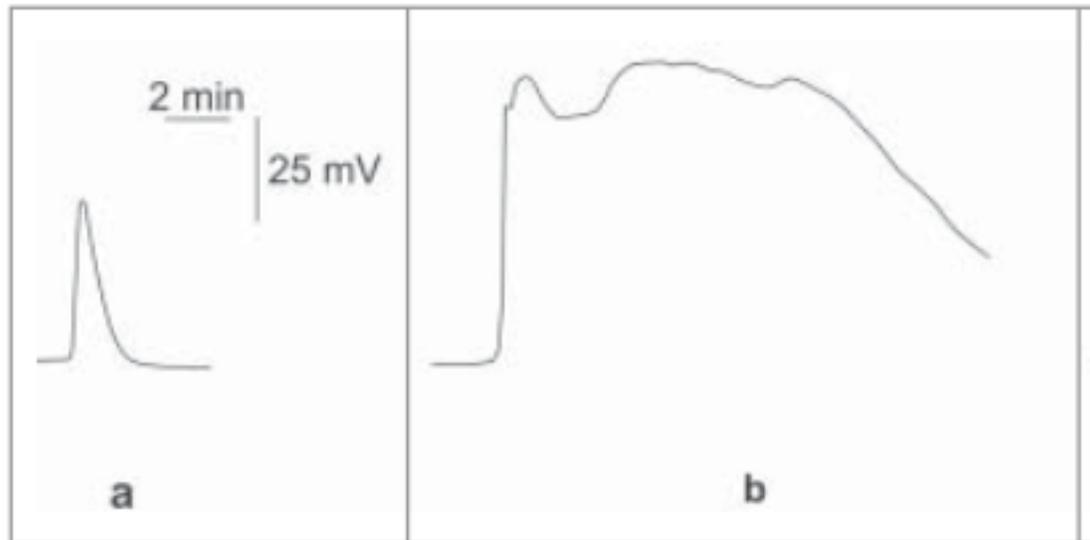


Figure 12 : Signaux électriques mesurés dans un hypocotyle de citrouille suite à différents stimuli. (a) Potentiel d'action (PA) induit après refroidissement de l'hypocotyle. (b) Onde lente induit par une brûlure. (Vodeneev *et al.* 2015).

12a) (Houwink 1935, Zawadzki *et al.* 1991, Wildon *et al.* 1992). Il est induit suite à divers stimuli tels qu'un changement de pression de turgescence (Zimmermann et Beckers 1978, Wendler *et al.* 1983), un changement de lumière, un traitement au froid, à la brûlure, suite à une blessure (Cheeseman et Pickard 1977, Zawadzki *et al.* 1991, Wildon *et al.* 1992, Stahlberg et Cosgrove 1994).

Le PA présente une période réfractaire d'une durée pouvant être supérieure à 2 heures durant laquelle tout nouveau stimulus ne provoque aucune réponse électrique au sein de la plante. Les mécanismes mis en marche, à l'échelle cellulaire, durant la genèse d'un PA impliquent notamment une modification de l'activité des canaux ioniques Ca²⁺ (influx), Cl⁻ (efflux) lors de la phase de dépolarisation, suivi par les canaux K⁺ (efflux) durant la phase de repolarisation (soit une modification de la composante passive du potentiel transmembranaire de repos) (Zimmermann et Beckers 1978, Lunevsky *et al.* 1983). Le mode de propagation du PA est de nature électrotonique. Le signal se propage via le phloème qui partage des propriétés communes avec les cellules nerveuses animales, à savoir l'existence de membranes excitables par lesquelles les excitations électriques peuvent se transmettre d'une cellule à l'autre. La vitesse de propagation est comprise entre 10 à 70 mm.s⁻¹ (Tabata et Sibaoka 1987, Fromm et Bauer 1994), et est considérée comme supérieure à celle de l'onde lente.

b. L'onde lente

Une onde lente peut se décrire en trois étapes : une phase de dépolarisation rapide semblable à celle du PA, une phase plateau où le potentiel transmembranaire stagne (courte), et une phase de repolarisation durant 1 à 45 minutes (figure 12b) (Julien, 1993). Une onde lente est induite suite à différents types de stimulus tels qu'une élévation de la pression de turgescence après un signal hydraulique positif (Malone et Stankovic 1991, Stahlberg et Cosgrove 1996), la mise en contact d'une tige coupée avec une extraction de tissus lésés (Sambeek et Pickard 1976), ou bien à la suite de blessure (piqûre d'insectes, brûlures) (Houwink 1935, Sambeek et Pickard 1976). Roblin et Bonnemain (1985) montre chez *Vicia faba* que l'amplitude de l'OL est proportionnelle à la surface des feuilles endommagée par brûlure.

L'OL, après un 1^{er} stimulus, présente une période réfractaire durant laquelle un second stimulus identique au 1^{er} ne déclenche aucune réponse. Cette période est de 2 heures en moyenne chez le *Bidens* (Julien 1993) et peut être de plusieurs heures chez la tomate (Sambeek et Pickard 1976). Les mécanismes prenant place dans la genèse d'une OL ne sont pas clairement identifiés. Julien (1993) observe, sur *Bidens*, un arrêt des pompes à protons du

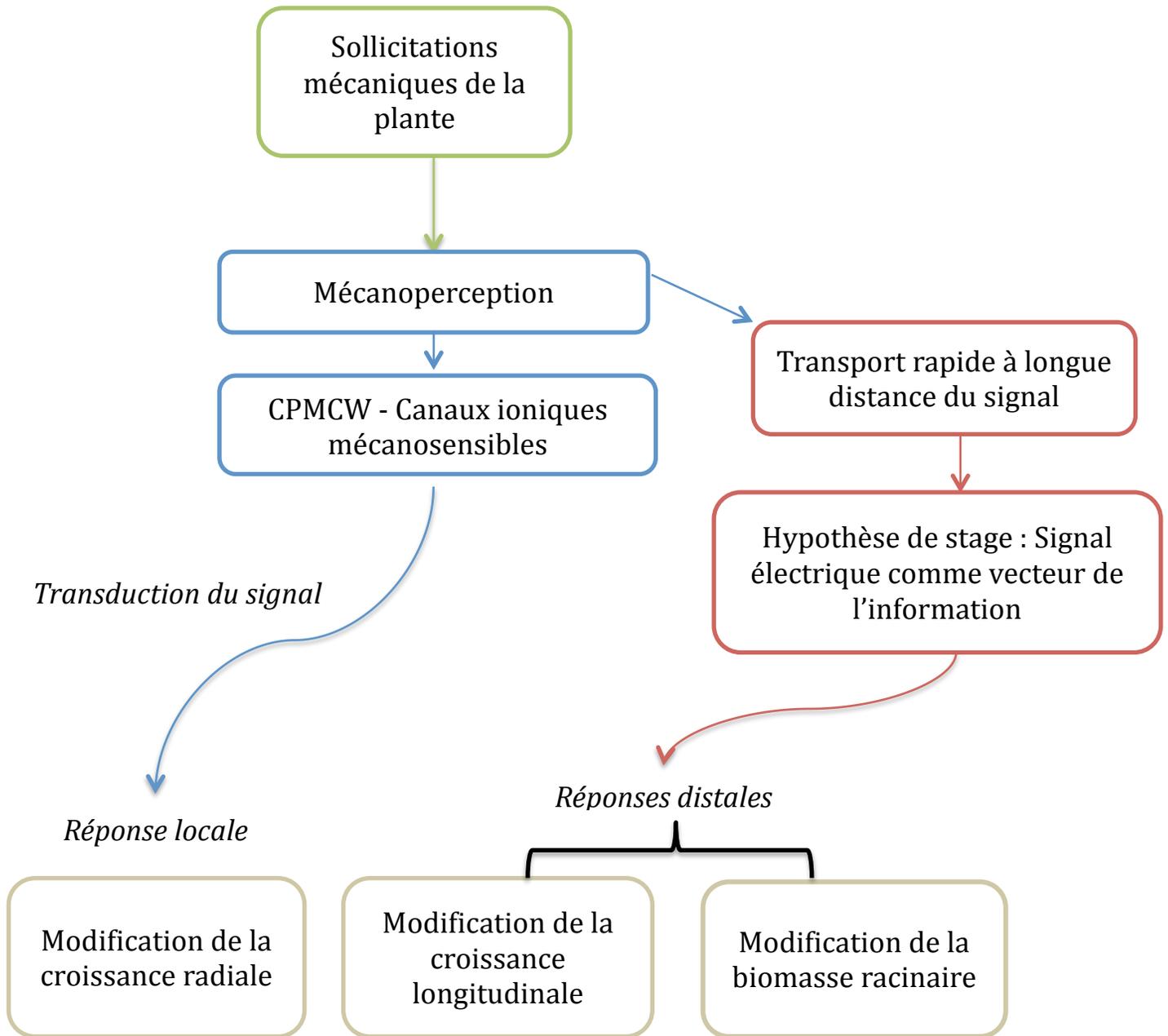


Figure 13 : Schéma récapitulatif de la synthèse bibliographique.

plasmalemme (composante active du potentiel de membrane) et une alcalinisation du pH apoplastique simultanément à l'enregistrement d'une OL. Le sens de propagation de l'OL, lié au flux transpiratoire, est préférentiellement acropète (Houwink 1935, Sambeek et Pickard 1976). Aucun consensus n'est atteint quant à la nature du mode de propagation de l'OL. Stahlberg et Cosgrove (1997) rejette une propagation de type électrotonique. Deux hypothèses demeurent : celle d'une propagation de type hydraulique (Malone et Alarcon 1995, Evans et Morris 2017), et celle d'une propagation de type chimique (Ricca 1916). En revanche, il y a consensus quant à la voie de propagation xylémienne et apoplasmique de l'OL, avec un sens préférentiellement acropète. La vitesse de propagation de l'OL est comprise entre 0,1 et 10 mm.s⁻¹ (Sibaoka 1953, Roblin et Bonnemain 1985). De plus, la vitesse et l'amplitude de l'onde lente semblent diminuer plus le site de stimulation est éloigné (Stanković et Davies 1997).

VI. Objectif de stage

L'arrêt de la croissance primaire intervient rapidement après une sollicitation mécanique (figure 13). Il implique l'existence d'un signal à longue distance encore inconnu à ce jour. L'un des candidats pour ce rôle est le signal électrique.

L'objectif de ce stage est d'étudier la propagation de l'information dans les organes situés à distance des zones stimulées. Il consistera, par des mesures électrophysiologiques, à vérifier si une flexion transitoire appliquée à une tige de peuplier génère un signal électrique capable de se propager dans la plante.



Figure 14 : Matériel végétal et conditions de culture. Les expériences sont réalisées sur des peupliers hybrides (*Populus tremula x Populus alba*, clone INRA 717-1B4) âgés de 3 à 4 mois. Les plants sont régénérés par culture *in vitro* à partir d'axes de tiges sur un milieu Murashige et Skoog (Murashige et Skoog 1962). Lorsque les plants ont atteint une hauteur d'environ 4 cm, ils ont été progressivement acclimatés sur une solution hydroponique. Les expériences sont réalisées une fois que les peupliers ont atteint une hauteur de 55 à 60 cm.

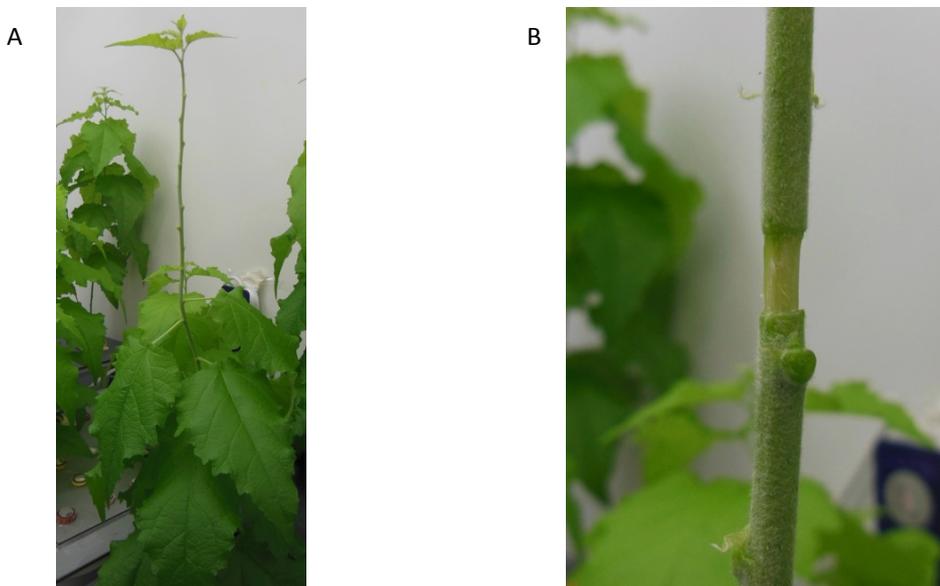


Figure 15 : Préparation des plantes pour la flexion. A) Les feuilles gênantes pour l'expérimentation de flexion sont éliminées à l'aide d'une lame de rasoir. Les plantes ainsi traitées sont laissées durant au moins 24 h sans intervention, puis elles sont préparées pour les mesures d'électrophysiologie. B) En plus de l'élimination de feuilles, sur un lot de plantes (n=3) la tige a été décortiquée sur une section de 5 mm, à environ 8 cm du site de flexion. Les plantes ainsi traitées sont laissées durant au moins 24 h sans intervention, puis elles sont préparées pour les mesures d'électrophysiologie.

Matériels et méthodes

I. Le matériel végétal et les conditions de cultures

Les peupliers hybrides (*P. tremula* x *P. alba*, clone INRA 717-1B4) sont issus d'une multiplication clonale *in vitro* sur un milieu Murashige et Skoog (Murashige et Skoog 1962). Lorsqu'ils parviennent à une hauteur de 4 cm, les peupliers sont acclimatés à une culture en solution hydroponique (Morizet et Mingeau 1976). Ils sont alors gardés en chambre de culture (figure 14) dans les conditions phytotroniques suivantes : jours longs ; photopériode (jour/nuit : 16/8h) ; à 24°C et 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (jour), et 20°C (nuit) ; et 70 \pm 10% d'humidité relative. Les expérimentations sont réalisées avec des peupliers âgés de 3-4 mois, d'une taille comprise entre 55 et 60 cm et dont le diamètre de la tige est compris entre 4 et 4,5 mm en position basale, et entre 3,3 et 3,7 en position apicale.

II. Préparation des plantes pour la flexion :

Les feuilles sur le segment de tige fléchi sont éliminées à l'aide d'une lame de rasoir (figure 15A). Un lot de plantes (n=3) subit une étape de préparation supplémentaire : à l'aide d'une lame de rasoir, l'épiderme, le phloème et l'assise cambiale sont enlevés de la tige (sur 5 mm de hauteur) à environ 8 cm de la zone de flexion (figure 15B). Les plantes sont maintenues sans intervention pendant au moins 24 h avant les flexions afin de leur laisser le temps de s'acclimater aux nouvelles conditions du laboratoire.

III. Les différentes stimulations

1. La stimulation lésante : la brûlure

La brûlure est effectuée au niveau d'une foliole, le long de la nervure centrale, à l'aide d'une allumette. La flamme est portée à 1 cm en dessous de la feuille durant 4 à 6 secondes.

2. La stimulation non lésante : la flexion

La sollicitation mécanique est réalisée sous la forme d'une flexion en plaquant soit la partie basale, soit la partie apicale de la tige autour d'un gabarit (tube en PVC) de rayon de courbure connu (0,8 cm et 1,25 cm) permettant ainsi une quantification de l'amplitude du stimulus. La tige est ainsi fléchie sur la longueur du tube (soit 13 cm). Connaissant le diamètre de la tige et le rayon de courbure du gabarit, la déformation longitudinale appliquée à la tige se calcule d'après l'équation :

$$\text{Déformation} = \frac{r}{(\rho + r)}$$



Figure 16 : Photos de gabarit évidé.

A

B

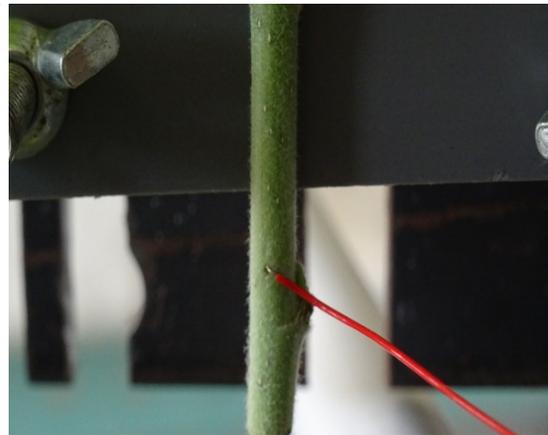
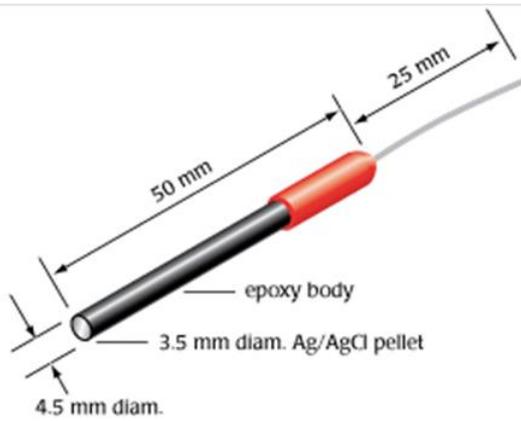


Figure 17 : A) Schéma de l'électrode de référence. B) Photo d'une électrode de mesure insérée dans la tige de peuplier.

Avec r le rayon de la tige au niveau de la zone fléchie, et ρ le rayon du gabarit. Ainsi, toute la zone fléchie est soumise à une déformation de même niveau et connue.

Les flexions sont réalisées manuellement à l'aide d'un appui en PVC. L'appui est d'abord délicatement mis en contact avec la tige, puis, après 10 secondes, la tige est fléchie contre le gabarit, l'aller-retour étant réalisé en environ 1 seconde.

- *Influence du contact tige-gabarit*

Afin de définir l'impact que peut avoir le contact de la portion de tige fléchie avec le gabarit, des gabarits ont été évidés sur le tiers de leur longueur (figure 16), ces gabarits sont nommés « gabarit évidé ». Une tige de peuplier fléchie sur un tel gabarit subit la même déformation qu'avec un gabarit non modifié mais avec une surface de contact réduite de 30%.

IV. Technique de mesure des potentiels électriques extracellulaires

1. Les électrodes

L'électrode de référence (World Precision Instruments, modèle RC3) est constituée d'une demi-pile d'Ag/AgCl de 3.5 mm de diamètre, entourée d'une gaine en époxy (figure 17A). Elle trempe dans la solution nutritive à environ 10 à 15 cm des racines du peuplier.

Les électrodes en cuivre sont de simples fils de cuivre étamés (entourés d'une gaine d'étain ayant pour rôle de limiter l'oxydation du cuivre) d'un millimètre de diamètre. Une des extrémités est insérée soigneusement dans la tige du peuplier (figure 17B), et l'autre est reliée à l'appareillage électronique.

2. Appareillages électroniques

Les électrodes, dont l'électrode de référence, sont reliées à un amplificateur. La source de signaux bioélectriques peut être assimilée à un générateur dont la résistance interne (résistance du tissu + résistance des électrodes) est très élevée.

Il est nécessaire que la résistance d'entrée de l'amplificateur soit au minimum 100 fois supérieure à celle du générateur biologique pour que ce dernier ne soit pas « shunté », c'est-à-dire éviter qu'une partie du courant électrique de l'appareillage ne dérive dans la plante.

Les électrodes sont donc reliées à deux amplificateurs adaptateurs d'impédance (WPI, modèle KS-700 dont la résistance est de $10^{11} \Omega$; WPI modèle FD223 dont la résistance est de $10^{15} \Omega$). Ces amplificateurs sont reliés à une carte d'acquisition (qui possède son propre module d'impédance à $10G\Omega$) qui a pour rôle de convertir les signaux analogiques perçus par les électrodes en signaux numériques. Ces signaux sont ensuite visualisés et enregistrés sur un ordinateur via le logiciel DAQExpress (National Instrument, DAQExpress). Le logiciel permet de choisir la fréquence d'acquisition du signal. Les enregistrements du signal lorsque

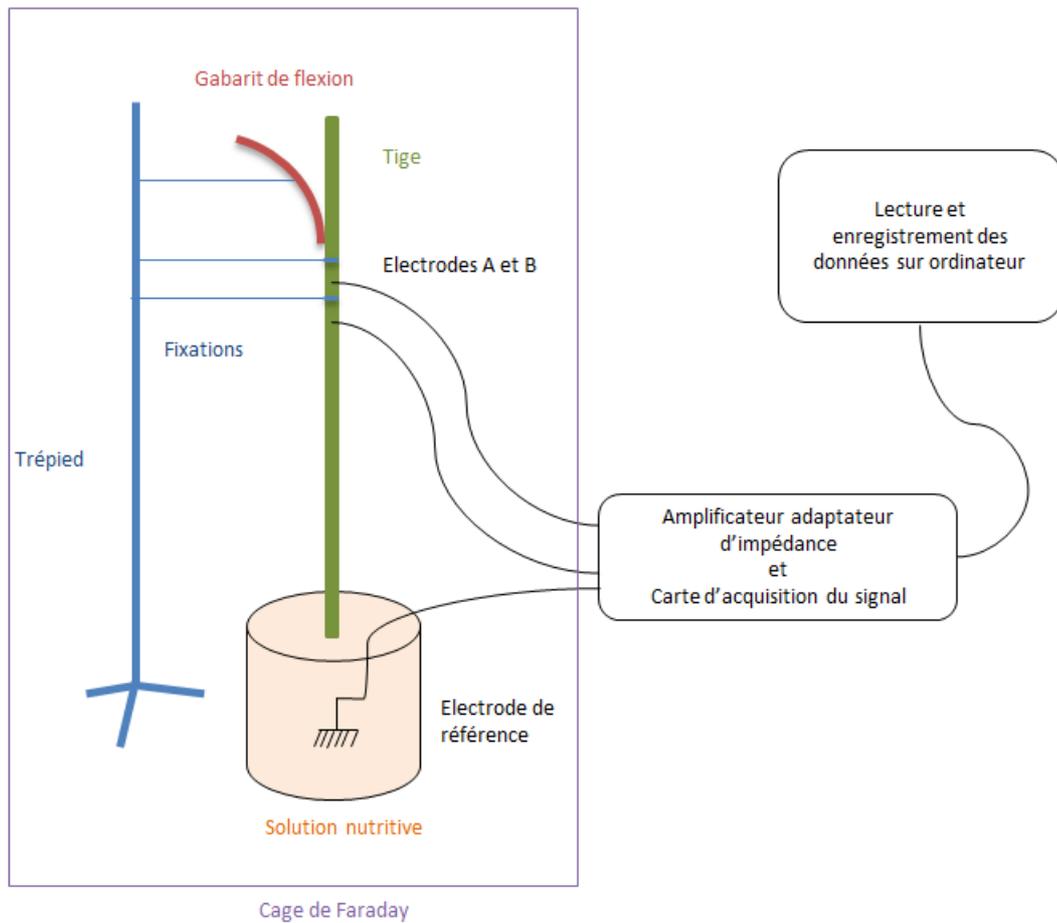


Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental de mesure d'électrophysiologie. Le peuplier est suspendu dans une solution nutritive à l'aide de deux fixations enserrant la tige avec de la mousse afin d'éviter toute blessure. Un gabarit de flexion est placé en contact avec la tige, soit en position apicale (comme représenté ici), soit en position basale. Deux électrodes de mesures sont insérées délicatement dans la tige. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. Les électrodes sont reliées à un amplificateur adaptateur d'impédance, lui-même relié à la carte d'acquisition du signal où le signal analogique est converti en signal numérique qui est transmis à un ordinateur où il sera visualisé en direct et enregistré. Le matériel électronique est placé en dehors de la cage de Faraday.

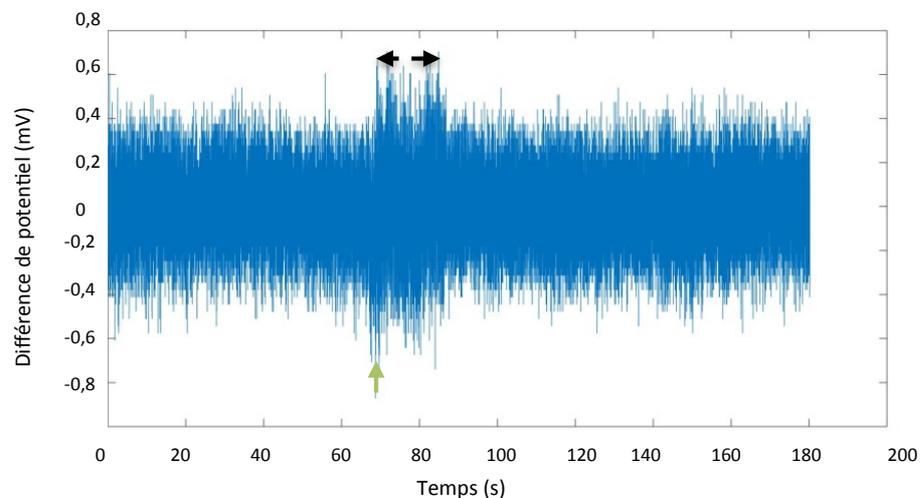


Figure 19 : Mise en évidence du signal de toucher. L'appui en PVC utilisé pour fléchir la tige est mis en contact avec celle-ci (flèche verte) durant 10 secondes (flèches noires). Le toucher provoque une augmentation du bruit de fond de l'ordre de 0,2 à 0,5 mV. Aucune flexion n'a été réalisée.

la plante est stimulée par la brûlure sont réalisés à une fréquence d'échantillonnage de 10 Hz. Les enregistrements du signal électrique après une stimulation par la flexion sont réalisés à une fréquence d'échantillonnage de 1000 Hz. Cette différence de fréquence d'échantillonnage s'explique par la durée que réclame chacun de ces types d'enregistrements.

3. Protocole expérimental

Le peuplier est suspendu dans une solution nutritive à l'aide de deux fixations enserrant la tige avec de la mousse afin d'éviter toute blessure. L'utilisation de deux points de fixation proche de la zone de flexion permet de garantir l'immobilisation du reste de la tige et ainsi d'éviter tout mouvement des électrodes une fois insérées dans la tige, et donc d'éviter la perturbation du signal électrique. Un gabarit de flexion est placé en contact avec la tige, soit en position apicale (comme représenté figure 18), soit en position basale. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. Les électrodes de mesures sont rincées à l'eau puis insérées dans la tige. Comme mentionné précédemment, les électrodes sont reliées à un amplificateur adaptateur d'impédance, lui-même relié à la carte d'acquisition qui transmet un signal numérique à un ordinateur où il sera visualisé en direct et enregistré via le logiciel DAQExpress. 6 à 24h sont nécessaires pour que le signal se stabilise une fois que les électrodes sont plantées dans les plants. Lorsque le signal est stabilisé depuis au moins une heure, une flexion peut être réalisée. La cage de Faraday est une enceinte en aluminium fabriquée lors du stage et dans laquelle le dispositif est placé excepté le matériel électronique. Elle permet de bloquer toutes perturbations électriques et électromagnétiques qui pourraient interférer avec les mesures d'électrophysiologie réalisée sur la plante.

V. Traitement des données

Les données numériques du signal sont exportées du logiciel DAQExpress sous format *TDMS*, puis ouvert avec MatLab® pour les traiter et les visualiser graphiquement.

- *Tests statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel R. Un test de Kruskal et Wallis et un test post-hoc de Dunn sans correction de Bonferroni ($p < 0,005$) ont permis de comparer d'une part les amplitudes moyennes et d'autre part les durées du signal.

VI. Cytologie

Des coupes transversales de tige de peuplier décortiquée et non décortiquée ont été réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir. Ces coupes ont été colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique (grossissement x100, Axioskop 40, Carl Zeiss). Elles ont permis de déterminer les tissus encore présents après la décortication.

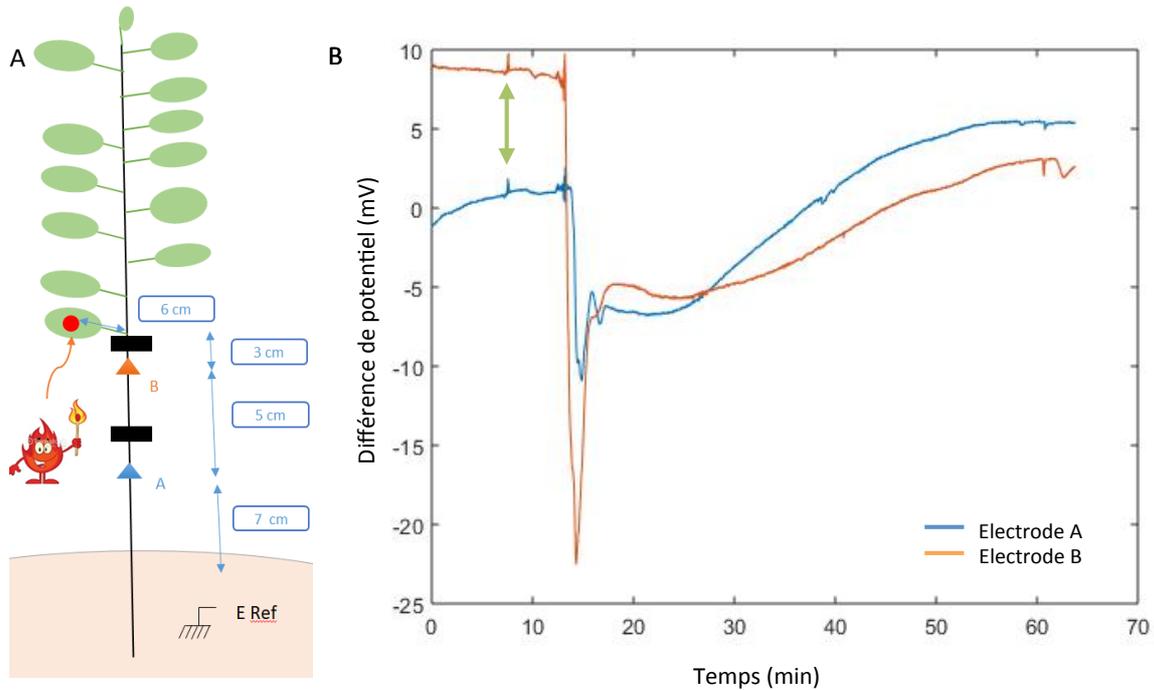


Figure 20 : Variation de potentiel après brûlure d'une foliole. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une brûlure d'une foliole. L'électrode ▲A est insérée dans la tige à environ 14 cm de la brûlure. L'électrode ▲B est insérée dans la tige à environ 9 cm de la brûlure. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La brûlure est réalisée à l'aide d'une allumette, la flamme est approchée à 1 cm de la foliole durant 4 à 6 secondes. B) Variations de potentiels représentatives de 20 enregistrements obtenus après brûlure de foliole. La flèche verte indique la brûlure.

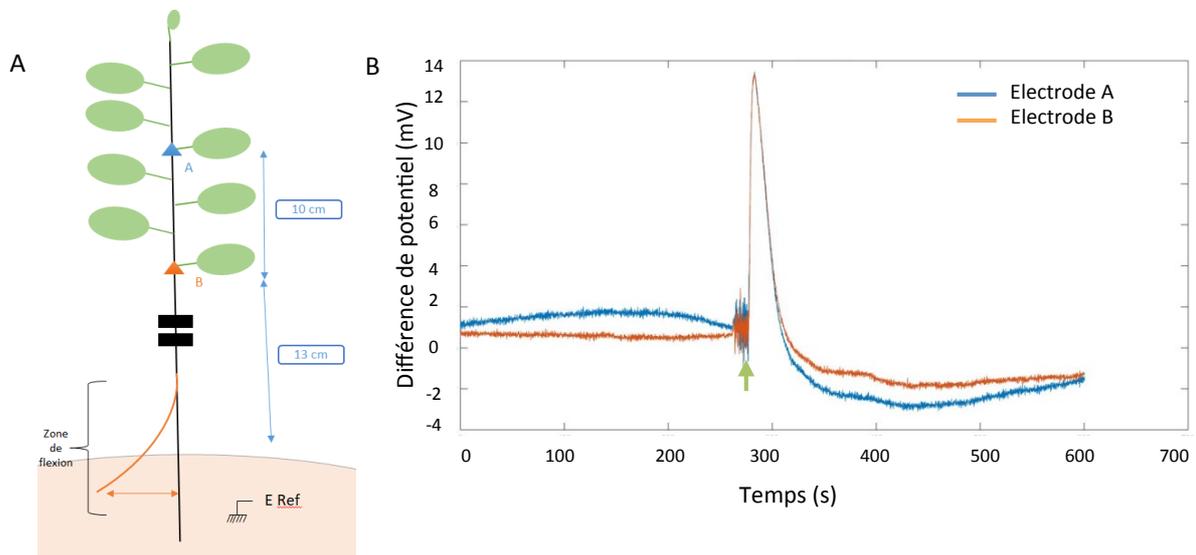


Figure 21 : Variation de potentiel après une flexion basale de la tige. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une flexion de la tige. L'électrode ▲B est insérée dans la tige à environ 13 cm du milieu du site de flexion. L'électrode ▲A est insérée dans la tige à 23 cm du milieu du site de flexion. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La tige est fléchée à l'aide d'un tuyau contre un gabarit, le tuyau est mis en contact avec la tige 10 secondes avant la flexion. B) Variations de potentiels représentatives de 5 enregistrements obtenus après flexion basale de la tige. La flèche verte indique quand la tige est fléchée. L'amplitude et la durée moyennes mesurées sont identiques sur les deux électrodes à +11,8 mV et 64,2s.

Résultats

I. Identification du signal de toucher avant flexion

Les flexions sont réalisées manuellement à l'aide d'un appui en PVC. L'appui est d'abord délicatement mis en contact avec la tige, puis, après 10 secondes, la tige est fléchie contre le gabarit, l'aller-retour étant réalisé en environ 1 seconde. L'application du tuyau sur la tige déstabilise légèrement le signal électrique mesuré dans la plante (figure 19), cette perturbation correspond à une légère augmentation du bruit de fond (± 0.5 mV). L'application durant 10 secondes du tuyau avant de procéder à la flexion permet de séparer au mieux l'effet de toucher et l'effet de flexion sur le signal mesuré.

II. Variation de potentiel après une brûlure de feuille

Trois peupliers ont été soumis seulement à une brûlure d'une feuille (figure 20A) ainsi que chaque peuplier stimulé par la flexion de la tige, après application de cette dernière. La figure 20B présente une évolution de la variation de potentiel mesurée, représentative de vingt enregistrements. Dans tous les cas, après brûlure d'une foliole, une variation de potentiel est mesurée sur les électrodes insérées dans la tige (figure 20B). Cette variation de potentiel atteint systématiquement l'électrode la plus proche du site de brûlure puis la suivante. À partir de ce décalage il est possible d'estimer une vitesse de déplacement de cette variation de potentiel de $2,1 \text{ mm.s}^{-1}$ ($n=20$). Plus une électrode est positionnée à grande distance du site de brûlure plus l'amplitude du signal est réduite. Le signal se déplace aussi bien dans le sens basipète qu'acropète. Pour chaque brûlure, des amplitudes différentes ont été mesurées pour chaque électrode. Un retour à la différence de potentiel d'avant brûlure est rarement observé et cela même après 2 heures d'enregistrement.

III. Electrode de mesures éloignées de la zone de Flexion dans le cas d'une flexion basale de la tige

Une série de 5 mesures a été effectuée en insérant deux électrodes de mesure dans la tige : l'électrode B étant placée à 13 cm du milieu de la zone de flexion, et l'électrode A à 23 cm de cette dernière. Dans cette configuration, c'est la partie basale de la tige qui a été fléchie (fig 21A). Une variation de potentiel est mesurée simultanément sur les deux électrodes (figure 21B). La variation de potentiel présente une amplitude moyenne de $+11,8$ mV parfaitement identique entre les électrodes A et B. La durée moyenne du signal est de $64,2$ s elle est aussi identique pour les deux électrodes ($n=5$).

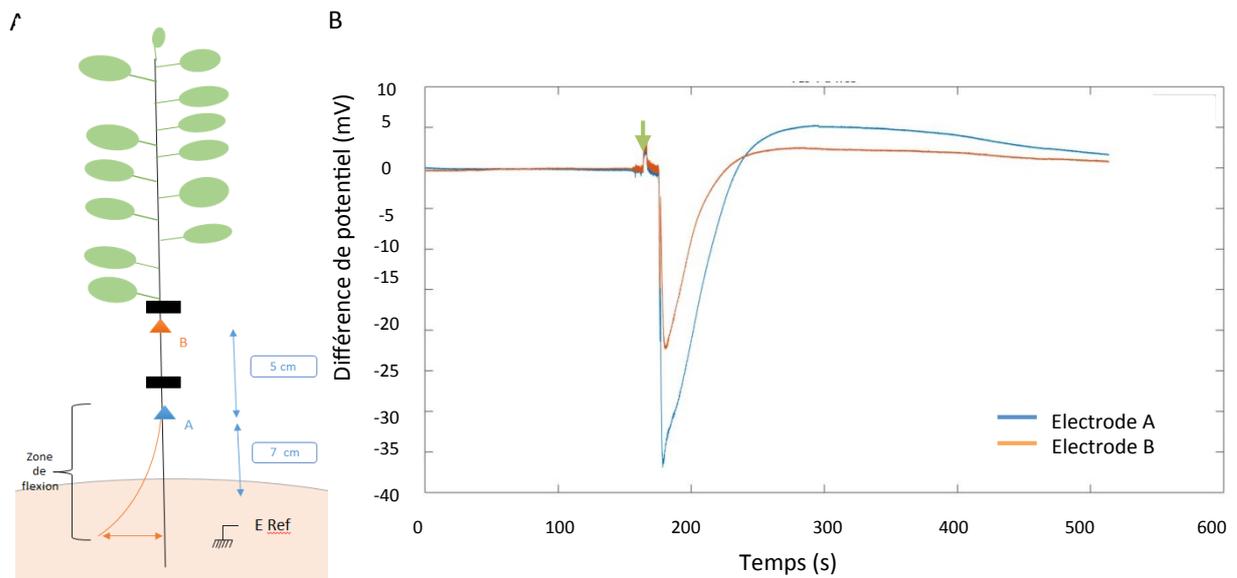


Figure 22 : Variation de potentiel après une flexion basale de la tige. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une flexion de la tige. L'électrode ▲ A est insérée dans la tige à environ 7 cm du milieu du site de flexion. L'électrode ▲ B est insérée dans la tige à 12 cm du milieu du site de flexion. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La tige est fléchie à l'aide d'un tuyau contre un gabarit, le tuyau est mis en contact avec la tige 10 secondes avant la flexion. B) Variations de potentiels représentatives de 3 enregistrements obtenus après flexion basale de la tige. La flèche verte indique quand la tige est fléchie. L'amplitude et la durée moyennes mesurées sur l'électrode ▲ A est à -33 mV et 67,3s, et à -27,3 mV et 54,4s sur l'électrode ▲ B (n=3).

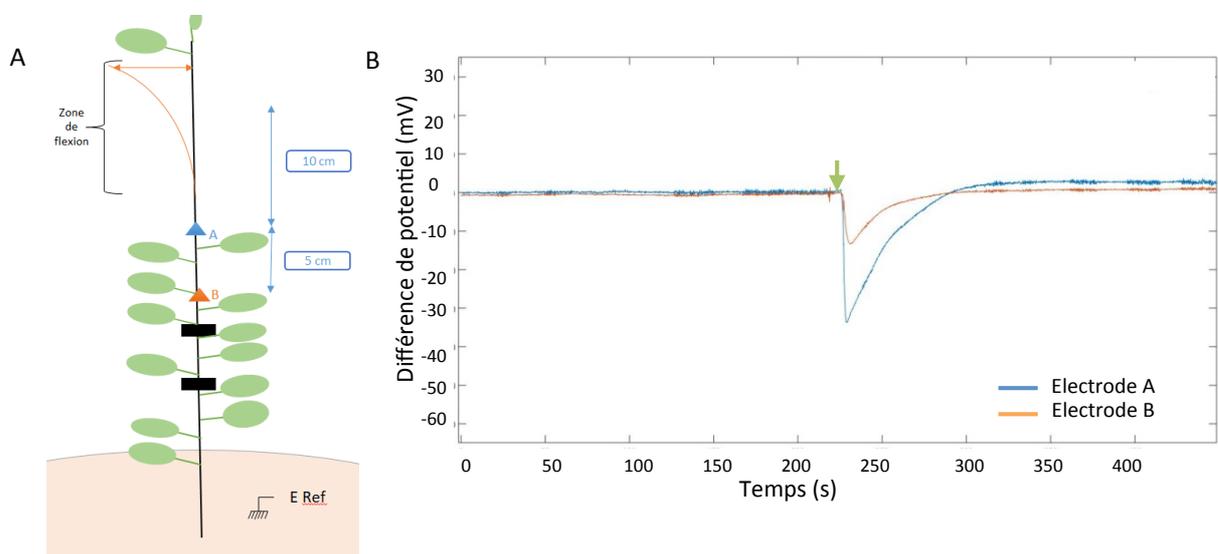


Figure 23 : Variation de potentiel après une flexion apicale de la tige. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une flexion de la tige. L'électrode ▲ A est insérée dans la tige à environ 7 cm du milieu du site de flexion. L'électrode ▲ B est insérée dans la tige à 12 cm du milieu du site de flexion. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La tige est fléchie à l'aide d'un tuyau contre un gabarit, le tuyau est mis en contact avec la tige 10 secondes avant la flexion. B) Variations de potentiels représentatives de 3 enregistrements obtenus après flexion apicale de la tige. La flèche verte indique quand la tige est fléchie. L'amplitude et la durée moyennes mesurées sur l'électrode ▲ A est à -31,9 mV et 58,7s, et à -8,7 mV et 52,2s sur l'électrode ▲ B (n=3).

IV. Electrode de mesures proches de la zone de Flexion dans le cas d'une flexion basale de la tige

Comme dans l'expérience précédente, la partie basse de la tige est fléchie contre le gabarit, mais ici les électrodes de mesures sont plus proches de la zone de flexion. L'électrode A est située à 7 cm du milieu de la zone de flexion et l'électrode B à 12 cm comme illustré sur la figure 22A. Suite à la flexion, une variation de potentiel de signe négatif est mesurée sur chacune des électrodes (figure 22B). La variation de potentiel atteint d'abord l'électrode A puis, environ 0,1s plus tard, l'électrode B. L'amplitude moyenne de la variation de potentiel mesurée par l'électrode A est de -33,04 mV (n=3), elle est supérieure, bien que non significativement différente, à l'amplitude moyenne de la variation de potentiel enregistrée par l'électrode B (-21,27 mV avec n=3). La durée moyenne de la variation de potentiel est également non statistiquement différente entre les électrodes A et B avec respectivement 61,6s et 54,5s (n=3).

V. Variation de potentiel suite à une flexion de tige en position apicale

La flexion en partie basse de la tige montre des variations d'amplitude de signe opposé suivant la position des électrodes par rapport à la zone de flexion. Comme dans l'expérience précédente, les électrodes sont positionnées proches de la zone de flexion. L'électrode A est insérée dans la tige à 10 cm du milieu de la zone de flexion et l'électrode B est insérée à 15 cm du milieu de cette dernière. En revanche ici, la flexion de la tige est appliquée dans la partie haute de la tige (figure 23A). Suite à la flexion, une variation de potentiel de signe négatif atteint les deux électrodes (figure 23B). La variation de potentiel atteint dans un premier temps l'électrode A, puis environ 0,1s plus tard, l'électrode B. L'amplitude moyenne de la variation de potentiel mesurée par l'électrode A est de -31,9 mV (n=3). Elle est significativement supérieure à l'amplitude moyenne de la variation de potentiel enregistrée par l'électrode B (-8,7 mV avec n=3). La durée moyenne de la variation de potentiel n'est pas statistiquement différente entre les électrodes A et B avec respectivement 58,7s et 52,2s.

VI. Influence du contact tige-gabarit sur la variation de potentiel générée par la flexion

Afin d'étudier l'influence du contact de la tige sur le gabarit sur la variation de potentiel générée lors de la flexion, un gabarit évidé de 30% de sa surface a été utilisé. Dans cette expérience, la tige a été fléchie en position apicale contre le gabarit évidé. Comme dans le cas précédent, les électrodes sont insérées dans la tige à proximité du milieu de la zone de flexion : à 7 cm pour l'électrode A et 12 cm pour l'électrode B (figure 24A). Suite à la

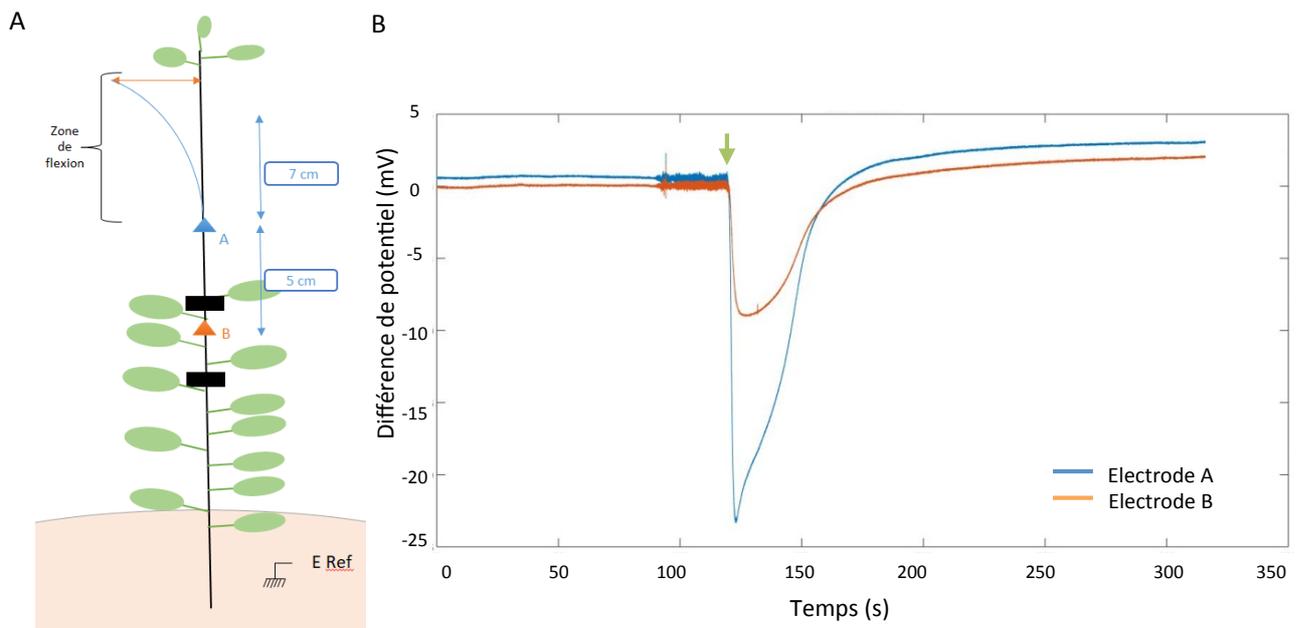


Figure 24 : Variation de potentiel après une flexion apicale de la tige contre un gabarit évidé. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une flexion de la tige. L'électrode ▲ A est insérée dans la tige à environ 7 cm du milieu du site de flexion. L'électrode ▲ B est insérée dans la tige à 12 cm du milieu du site de flexion. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La tige est fléchie à l'aide d'un tuyau contre un gabarit évidé d'un tiers de sa longueur, le tuyau est mis en contact avec la tige 10 secondes avant la flexion. B) Variations de potentiels représentatives de 3 enregistrements obtenus après flexion basale de la tige. La flèche verte indique quand la tige est fléchie. L'amplitude et la durée moyennes mesurées sur l'électrode ▲ A est à -28,3 mV et 132,1s, et à -23,5 mV et 120,4s sur l'électrode ▲ B (n=3).

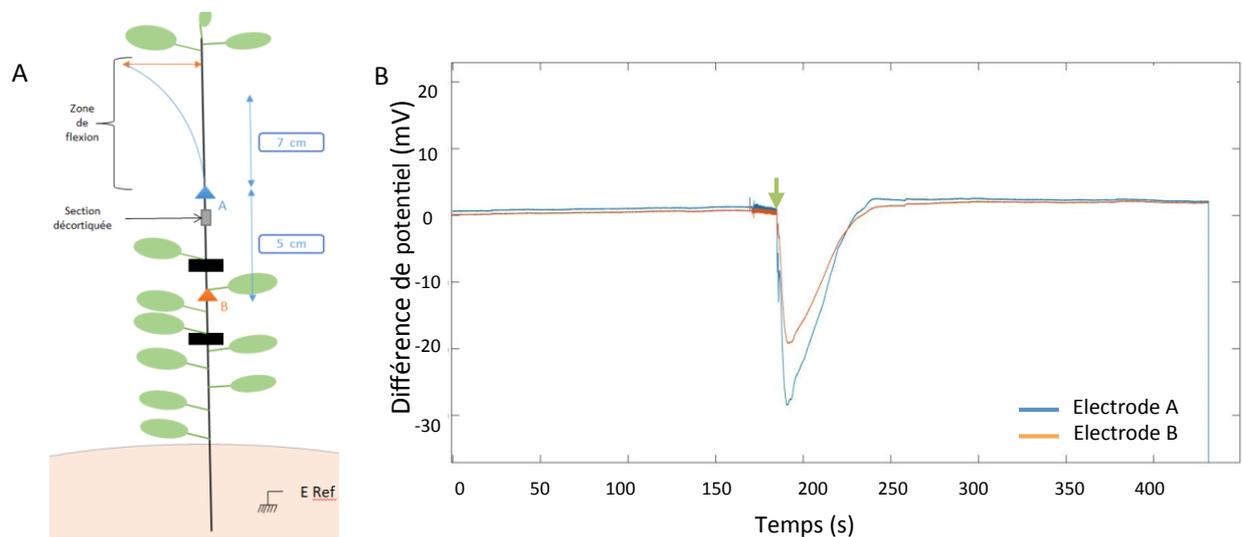


Figure 25 : Variation de potentiel après une flexion apicale d'une tige décortiquée. A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour détecter un changement de potentiel dans la tige suite à une flexion de la tige. L'électrode ▲ A est insérée dans la tige à environ 7 cm du milieu du site de flexion. L'électrode ▲ B est insérée dans la tige à 12 cm du milieu du site de flexion. L'électrode de référence est plongée dans la solution nutritive. La tige est fléchie à l'aide d'un tuyau contre un gabarit, le tuyau est mis en contact avec la tige 10 secondes avant la flexion. B) Variations de potentiels représentatives de 3 enregistrements obtenus après flexion apicale d'une tige décortiquée. La flèche verte indique quand la tige est fléchie. L'amplitude et la durée moyennes mesurées sur l'électrode ▲ A est à -22,4 mV et 38,3s, et à -8,4 mV et 44,2s sur l'électrode ▲ B (n=3).

flexion apicale, une variation de potentiel de signe négatif est mesurée sur chacune des électrodes (figure 24B). La variation de potentiel atteint d'abord l'électrode A puis, environ 0,1s plus tard, l'électrode B. L'amplitude moyenne de la variation de potentiel mesurée par l'électrode A est de -28,3 mV (n=3), elle est supérieure, bien que non significativement différente, à l'amplitude moyenne de la variation de potentiel à l'électrode B (-23,49 mV avec n=3). La durée moyenne de la variation de potentiel n'est pas statistiquement différente entre les électrodes A et B avec respectivement 132,1s et 120,4s (n=3).

VII. Variation de potentiel suite à une flexion sur une tige décortiquée

Afin de déterminer quel(s) est le(s) tissu(s) susceptible(s) d'être le(s) support(s) de propagation du signal observé, la tige a été décortiquée sur une section de 5 mm. Dans cette expérience, la tige a été fléchie en position apicale contre un gabarit, et comme dans les expérimentations précédentes les électrodes sont insérées dans la tige à proximité du milieu de la zone de flexion : à 7 cm pour l'électrode A et 12 cm pour l'électrode B (figure 25A). La section de tige décortiquée se trouve entre l'électrode A et l'électrode B. Afin de déterminer les tissus restant après la décortication de la tige, des coupes transversales des tiges dans leur partie décortiquée et dans leur partie non décortiquée ont été réalisées (figure 26). La section décortiquée ne présente plus que deux tissus : la moelle au centre et le xylème à la périphérie (comprenant des vaisseaux de xylème, des rayons xylémiens, des fibres xylémiennes et des cellules de parenchyme xylémien), tandis qu'une section non décortiquée de la tige présentera en plus de ces deux tissus, une assise cambiale, du phloème, des fibres de sclérenchyme, du parenchyme cortical et une couche d'épiderme.

Suite à la flexion, une variation de potentiel de signe négatif est mesurée sur chacune des électrodes (figure 25B). La variation de potentiel atteint d'abord l'électrode A puis, environ 0,1s plus tard, l'électrode B. L'amplitude moyenne de la variation de potentiel à l'électrode A est de -22,4 mV (n=3), elle est supérieure, bien que non significativement, à l'amplitude moyenne de la variation de potentiel à l'électrode B (-8,43 mV avec n=3). La durée moyenne de la variation de potentiel est similaire entre les électrodes A et B avec respectivement 38,3s et 44,2s (n=3).

Discussion

I. Interprétation du sens des variations de potentiels mesurées

Par une technique de mesure extracellulaire, des signaux électriques de la plante ont été étudiés. A la différence de mesures intracellulaires qui permettent de suivre le potentiel de

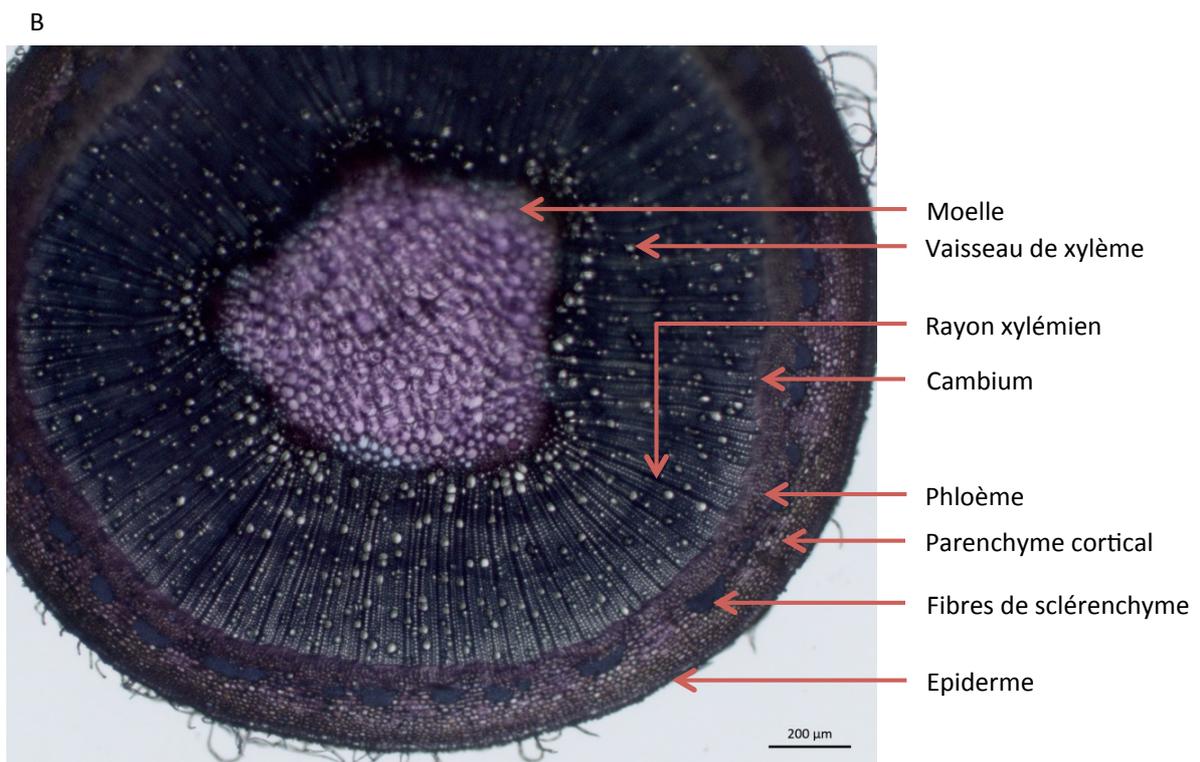
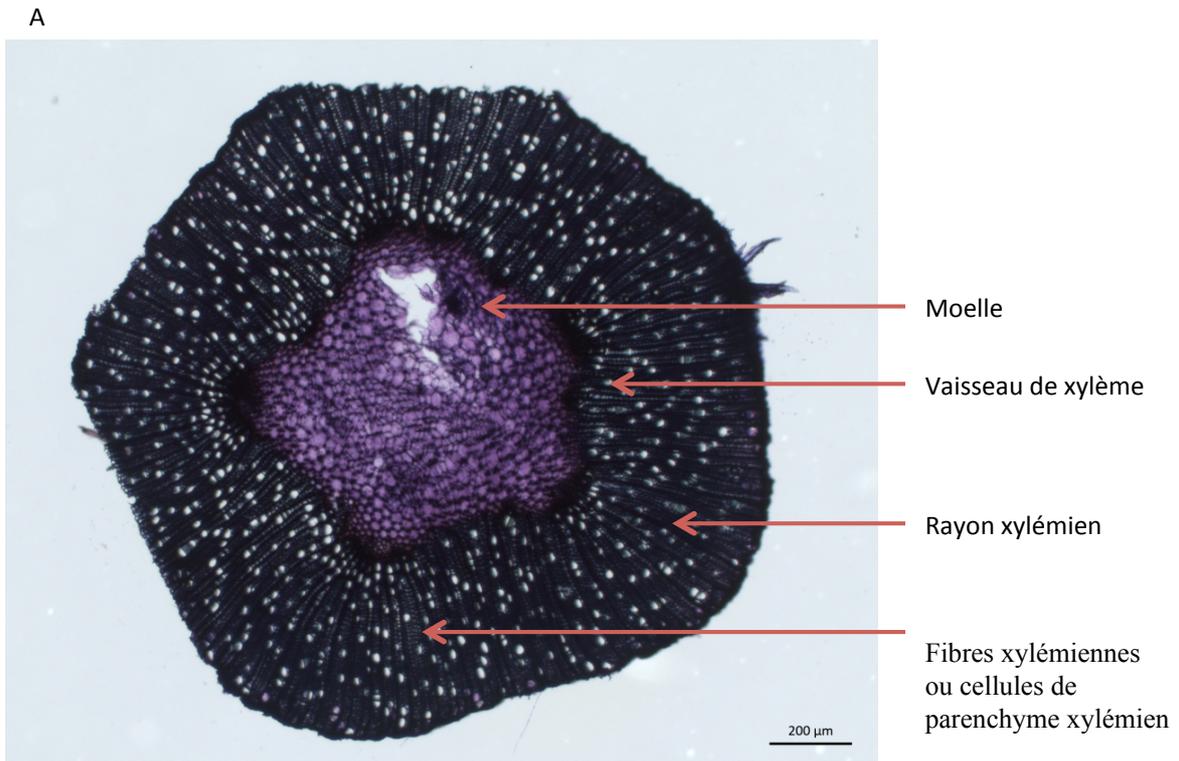


Figure 26 : Coupes transversales de tige de peuplier. A) Coupe transversale de tige de peuplier décortiquée observée au microscope et colorée au bleu toluidine. Après décortication de la tige à la lame de rasoir, les tissus subsistants sont la moelle au centre, et le xylème à la périphérie (comprenant des vaisseaux de xylème, des rayons xylémiens, des fibres xylémiennes et des cellules de parenchyme xylémien). B) Coupe transversale de tige de peuplier non décortiquée observée au microscope et colorée au bleu toluidine. Du centre à la périphérie s'observe : la moelle, le xylème, le cambium, le phloème, les fibres de sclérenchyme, le parenchyme cortical et l'épiderme.

membrane d'une cellule depuis son cytoplasme, les mesures extracellulaires donnent un aperçu des variations du potentiel de membrane d'un ensemble de cellules depuis l'apoplasme. Une microélectrode placée dans le symplasme indiquera un potentiel de membrane de repos négatif (entre -160 mV et -100 mV selon les cellules), une baisse de ce potentiel dans le sens négatif correspond à une hyperpolarisation de la membrane plasmique, alors qu'une augmentation de ce potentiel de membrane dans le sens positif correspond à une dépolarisation de la membrane plasmique. Les variations de potentiels mesurées avec une électrode extracellulaire sont ainsi corrélées négativement à celles mesurées depuis le symplasme (Pickard 1971 ; Frachisse, Communication personnelle). On en déduit qu'avec des électrodes extracellulaires, la mesure d'une variation de potentiel positive reflète une hyperpolarisation, et une variation de potentiel négative une dépolarisation.

Ainsi, la variation négative observée suite à une brûlure correspond à une dépolarisation des membranes plasmiques situées au voisinage des électrodes A et B (figure 20). Puis on observe une repolarisation lente (durée de 15 min à 2h), jusqu'à retrouver la différence de potentiel de repos. Les caractéristiques présentées par ce signal sont : 1) une dépolarisation, 2) un temps de retour à la différence de potentiel variable et potentiellement long, et 3) une vitesse de propagation de $2,1 \text{ mm.s}^{-1}$ permettant ainsi de l'identifier comme étant une onde lente. L'onde lente est décrite dans la littérature comme étant générée chez les plantes à la suite d'une stimulation lésante (Vodeneev *et al.* 2008).

Dans le cas d'une flexion dans la partie basse de la tige avec des électrodes positionnées à distance de la zone de flexion (figure 21A), la variation de potentiel enregistrée est de signe positif et devrait donc correspondre à une hyperpolarisation (+11,8 mV) des membranes plasmiques des cellules au voisinage des électrodes A et B (figure 21B). Puis on observe un retour rapide (64,2s en moyenne), à la différence de potentiel d'avant stimulation. Les caractéristiques présentées par ce signal : une hyperpolarisation se propageant à très haute vitesse (nous n'avons pas pu mesurer de délai entre les électrode A et B séparées de 10cm), ne semblent pas permettre de l'identifier à un signal connu.

II. Signal d'hyperpolarisation après une flexion basale de la tige avec des électrodes éloignées de la stimulation

Dans le cas d'une flexion de la tige en position basale avec des électrodes placées à distance de la zone de flexion, une hyperpolarisation est enregistrée (figure 21). Lorsque les électrodes sont positionnées à moindre distance de la zone de flexion c'est une dépolarisation

qui est enregistrée. Cette dualité dans les résultats obtenus après une même stimulation interroge sur la nature des variations de potentiel mesurées.

1. Validité du dispositif de mesure électrophysiologique

Dans cette étude, le rôle de la brûlure est notamment de générer un signal ‘témoin positif’ permettant de valider le fonctionnement du dispositif de mesure électrophysiologique. Chaque peuplier fléchi a aussi subi une brûlure de foliole. Pour chacune de ces brûlures il a été possible d’identifier de par ses caractéristiques le signal de dépolarisation (figure 20) comme correspondant à une onde lente (Fromm et Lautner 2007) et ainsi de valider le dispositif de mesure.

2. L’hyperpolarisation dans la bibliographie

Une hyperpolarisation correspond à une augmentation du nombre de charges négatives dans le cytoplasme des cellules par rapport à l’apoplasme. On explique une hyperpolarisation par la stimulation de l’extrusion électrogénique des protons ou par un changement dans la conductance d’au moins un type d’ion. Ainsi, les mécanismes d’ouverture/fermeture des cellules de gardes des stomates mettent en jeu des hyperpolarisations locales *via* l’action de canaux K^+ d’efflux (Maathuis *et al.* 1997). Chez l’algue unicellulaire *Eremosphaera viridis* la passage à l’obscurité provoque une hyperpolarisation d’amplitude +9 mV qui dure 50s et qui est générée suite à l’ouverture de canaux K^+ après une entrée de Ca^{2+} dans le cytosol (Schonknecht *et al.* 1998). Ces deux cas d’hyperpolarisation sont localisés à l’échelle de la cellule et ne se propagent pas. L’hyperpolarisation en tant que signal se propageant à travers une plante ne semble pas avoir été décrite dans la bibliographie.

3. Signal perçu par l’électrode de référence

Le signal d’hyperpolarisation mesuré lors d’une flexion en position basale de la tige avec des électrodes éloignées du site de flexion peut s’expliquer par une perturbation de l’électrode de référence. En effet, l’électrode de référence est plongée dans la solution nutritive qui est conductrice ce qui rend l’électrode de référence sensible à une variation de potentiel qui se propagerait dans la tige jusqu’à l’interface tige-solution. Comme le signal enregistré par les électrodes insérées dans la tige correspond à la différence de potentiel avec l’électrode de référence, une hyperpolarisation est observée sur ces dernières. Ce raisonnement permet d’expliquer pourquoi l’hyperpolarisation est observée de manière simultanée sur les deux électrodes de mesures pourtant éloignées entre elles de plusieurs cm. Il permet aussi de déduire que le signal généré par la flexion de la tige ne se déplace pas sur une grande distance dans le sens acropète. Les expériences effectuées avec des électrodes

proches de la zone de flexion et proches entre elles confirment cette interprétation (figures 22, 23, 24 et 25).

III. Caractérisation du signal de dépolarisation après flexion

1. Influence du contact tige-gabarit sur le signal de dépolarisation

Afin de déterminer si le signal de dépolarisation est influencé par le contact de la tige sur le gabarit lors de la flexion, une expérimentation de flexion de la partie haute de la tige sur un gabarit évidé d'un tiers de sa longueur a été réalisée. L'amplitude moyenne du signal alors enregistré lors de cette expérimentation ne présente pas de différence significative avec l'expérimentation avec gabarit plein pour une flexion similaire de la même zone (respectivement d'amplitude moyenne de -28.3 mV et -31,9 mV). Il semblerait que donc l'influence du contact gabarit-tige soit négligeable en comparaison avec la réponse électrique générée par la flexion de la tige elle-même.

2. Comparaison avec le potentiel d'action

Par certaines des caractéristiques (notamment sa forme) qu'il présente, le signal de dépolarisation mesuré après flexion de la tige de peuplier ressemble à un potentiel d'action.

Les amplitudes enregistrées sont en moyenne de -27,4 mV (comprises entre -8,2 et -37,5 mV) ; ce qui est comparable aux valeurs d'amplitude de potentiel d'action recensées par Lang et Volkov (2008). La durée du signal de dépolarisation est homogène. Elle est en moyenne de 74,1s, alors que celle d'un potentiel d'action est le plus souvent comprise entre 15 et 300s (Lang et Volkov 2008).

Les potentiels d'action sont connus pour se propager aussi bien dans le sens basipète qu'acropète (Zawadzki *et al.* 1991). Le signal de dépolarisation mesuré après la flexion se propage dans le sens acropète et basipète comme le montre respectivement les résultats en flexion de la partie basse (figure 22) et en flexion de la partie haute (figures 23,24 et 25).

La période réfractaire est définie comme la période suivant la propagation d'un potentiel d'action durant laquelle les cellules ne sont plus excitables. Cette période semble varier selon les espèces allant de 4 à 40s chez les Characeae et 2 à 4 min chez *Conocephalum* (Fromm et Lautner 2007). Le potentiel d'action serait soumis à une période réfractaire relative durant laquelle des stimulations répétées déclenchent des PA de plus en plus petits. D'après des résultats préliminaires, obtenus en appliquant, deux flexions de tige séparées d'une heure sur le même peuplier, une diminution l'amplitude du signal de dépolarisation lors de la seconde flexion a été mis en évidence, ce qui pourrait correspondre à une période réfractaire relative.

En revanche, par certaines caractéristiques, le signal de dépolarisation obtenu après flexion semble se comporter différemment d'un potentiel d'action.

D'après certains auteurs, un potentiel d'action se propage avec une amplitude constante (Stanković et Davies 1997, Stankovic *et al.* 1998). Or le signal de dépolarisation que l'on observe après flexion présente une amplitude qui tend à diminuer avec la distance.

La loi du tout ou rien caractérise le potentiel d'action. Elle stipule que la force du stimulus doit passer un certain seuil pour déclencher un potentiel d'action (Zawadzki *et al.* 1991) et qu'augmenter l'intensité du stimulus ne changera pas l'amplitude et la durée du potentiel d'action (Fromm et Lautner 2007). D'après des données préliminaires (résultats non montrés), une flexion très lente engendre un signal de dépolarisation de très faible amplitude (-5 mV), alors qu'une flexion rapide (1s) engendre un signal d'amplitude moyenne de -27,4 mV.

La vitesse de propagation du potentiel d'action est de l'ordre du cm.s^{-1} . Dans nos expériences, le signal de dépolarisation mesuré après une flexion montre une vitesse estimée à $0,5\text{m.s}^{-1}$, soit très nettement supérieure à la majorité des vitesses relevées dans la bibliographie (Lang et Volkov 2008).

Enfin, le potentiel d'action est un signal décrit comme s'auto-propageant par des boucles de courants locaux sur les membranes des cellules vivantes. Il serait susceptible d'emprunter deux voies les cellules parenchymateuses et les tubes criblés du phloème (Sukhov *et al.* 2011). Or, le signal de dépolarisation enregistré après une flexion de tige semble pouvoir se propager indépendamment de ces deux voies. En effet, d'après les résultats § VII, le signal de dépolarisation est capable de se propager dans une tige décortiquée, c'est-à-dire dans une section de tige dépourvue de cellules excitables.

IV. Mode de propagation du signal de dépolarisation après flexion

Le signal de dépolarisation mesuré après une flexion de tige est capable de passer à travers une section de tige décortiquée, suggérant que le xylème et/ou la moelle pourraient être les tissus supports de la propagation du signal.

1. Hypothèse d'une propagation par le xylème : similarité avec l'onde lente

Il est possible de diviser les mécanismes de signalisation électrique en deux catégories : ceux qui requièrent des cellules vivantes pour se propager parce que le signal utilise les membranes des cellules, et ceux qui ne requièrent pas de cellules vivantes. Les cellules identifiées comme étant excitables, et donc susceptibles de permettre l'auto-propagation d'un signal électrique comme un potentiel d'action, sont les cellules parenchymateuses et les tubes criblés du phloème (Sukhov *et al.* 2011). Le signal de

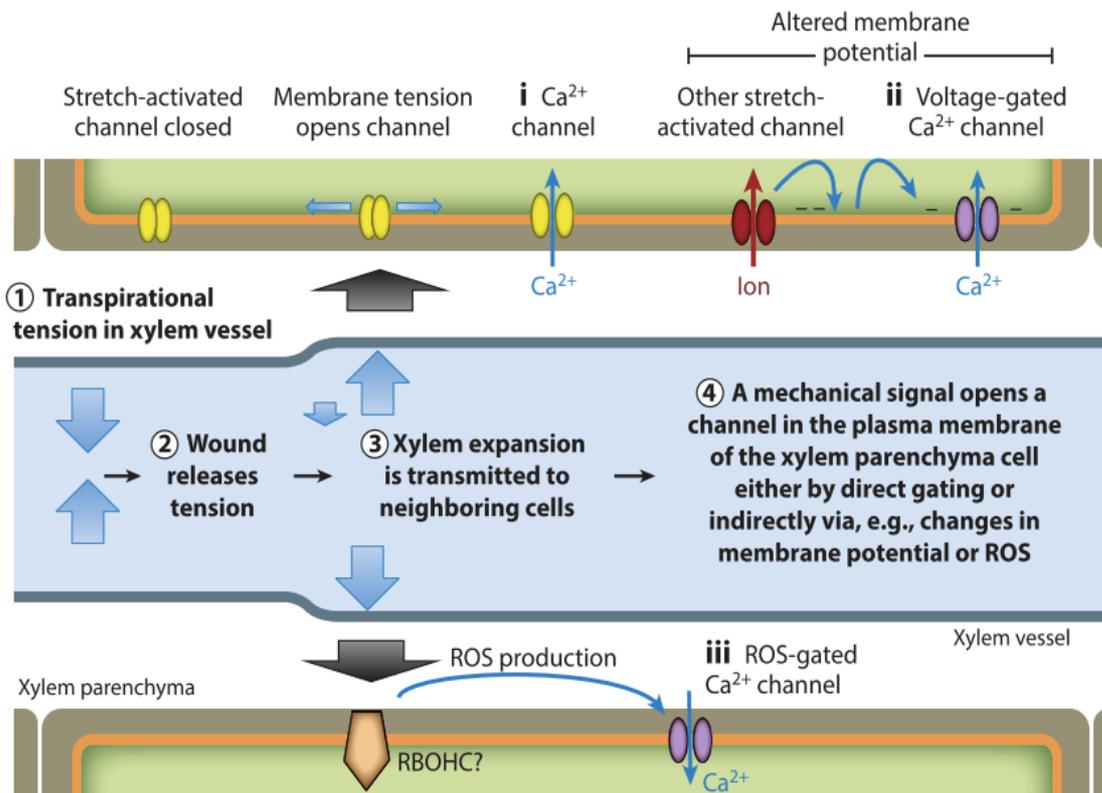


Figure 27 : La ‘Squeeze Cell Hypothesis’ de Farmer *et al.* (2014) adaptée par Choi *et al.* (2016). Une stimulation lésante générerait un relâchement de tension dans le xylème qui se propagerait rapidement. Ce changement de pression déclencherait l’ouverture directe ou indirecte de canaux ioniques mécanosensibles des cellules de parenchyme du xylème, provoquant une entrée de Ca²⁺ dans leur cytosol ainsi qu’une éventuelle production d’espèces activées de l’oxygène (ROS), premiers éléments d’une réponse à l’échelle cellulaire.

dépolarisation obtenu après flexion passant par le xylème ne s'auto-propagerait donc pas ; à l'instar de l'onde lente.

L'onde lente peut être mesurée au-delà de régions 'mortes' ou de tissus traités chimiquement de manière à bloquer la génération du signal suggérant un mode de propagation différent de celui du potentiel d'action. Deux hypothèses alternatives sont proposées : le mouvement rapide d'un agent chimique transporté par un « mass flow xylémien » (ou onde de dispersion), et, une onde de pression se propageant à travers le xylème (Evans et Morris 2017).

2. La « Squeeze Cell Hypothesis »

Le scénario dans lequel un stress mécanique (blessure, chaleur) génèrerait un signal hydraulique, qui lui-même induirait une onde de dépolarisation électrique, est suggéré par Julien dès 1993. Plus récemment ce scénario a été repris dans la 'squeeze cell hypothesis' de Farmer *et al.* (2014). Cette hypothèse prédit qu'un changement de pression généré par une blessure se propagerait dans le xylème (Malone *et al.* 1994) et provoquerait l'ouverture directe ou indirecte de canaux Ca²⁺ mécano-sensible (Monshausen *et al.* 2009). En découlerait une onde de dépolarisation de type onde lente dont dépend l'activation de la voie des jasmonates (Mousavi *et al.* 2013) observée au niveau des cellules de contact dans le xylème (Chauvin *et al.* 2013). La 'squeeze cell hypothesis' est illustrée par Choi et collaborateurs (2016, figure 27).

3. Application de la « Squeeze Cell Hypothesis » dans un cas de flexion

La Squeeze Cell Hypothesis repose sur l'existence d'un signal hydraulique généré par un stimulus mécanique lésant (blessure). Sa pertinence dans le cas de stimuli mécaniques non lésants comme la flexion, n'a pas encore été envisagée. L'existence de signaux hydrauliques dans le cas de déformations mécaniques non lésantes comme la flexion a été mise en évidence récemment par Lopez et ses collaborateurs (2014). Une surpression transitoire (100 kPa) est observée instantanément après la flexion d'une tige de peuplier appliquée à l'aide d'un gabarit suivant une méthode similaire à celle utilisée dans ce travail. Cette surpression se propage dans les sens acropète et basipète et elle dépend de l'amplitude de la déformation (Lopez *et al.* 2014, Louf *et al.* 2017). La génération d'une onde de pression hydraulique dans une tige fléchie apparaît être un mécanisme commun aux arbres. L'amplitude de l'onde de pression dépend d'un paramètre structurel clé : le « bulk modulus », une propriété mécanique représentant une rigidité de la branche (Louf *et al.* 2017).

Cette surpression du xylème se propageant dans la tige pourrait générer le signal de dépolarisation mesuré lors de nos expérimentations, à l'image de la 'Squeeze Cell

Hypothesis'. Cette surpression et cette dépolarisation ont comme caractéristiques communes d'être générées toutes les deux dans la seconde qui suit la flexion de la tige. De plus, nous avons obtenu des résultats préliminaires qui indiquent que l'amplitude de la dépolarisation mesurée après une flexion pourrait varier avec la rigidité de la tige : certaines flexions ont été réalisées dans une zone proche de l'apex de la tige de peuplier (plus souple) et les amplitudes de dépolarisation obtenues ne dépassaient pas les -10 mV, ce qui est bien moindre de ce que nous avons mesuré lors de la flexion de tronçons de tige plus rigides. Enfin, d'autres résultats préliminaires semblent aussi montrer que la vitesse de flexion influence l'amplitude du signal de dépolarisation, comme l'amplitude du signal hydraulique (Peraudeau 2011).

En définitive, si le signal de dépolarisation observé après flexion présente des caractéristiques communes avec le potentiel d'action comme sa forme et sa durée, il pourrait bien partager avec l'onde lente un même mécanisme de propagation via le xylème suite à une onde de pression hydraulique.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était de déterminer si un signal de nature électrique peut être induit par une flexion unique de tige de peuplier. Pour cela, nous avons développé un dispositif de mesures électrophysiologiques extra cellulaires couplé à un banc de flexion.

Nos expérimentations montrent qu'un signal de dépolarisation se propage à travers la tige lorsque cette dernière est fléchie. Par son amplitude, sa durée et sa capacité à se déplacer dans les sens basipète et acropète, le signal de dépolarisation montre des caractéristiques de potentiel d'action, un signal électrique commun chez les plantes. Cependant, d'autres critères comme son amplitude présentant une atténuation avec la distance, son présumé non-respect de la loi du tout ou rien, ainsi que sa haute vitesse semblent le démarquer du potentiel d'action. Enfin un dernier point le distingue d'un potentiel d'action : son mode de propagation non-électrotonique démontré par sa capacité à être visualisé après avoir traversé une section de tige privée de cellules excitables.

Cette dernière observation nous amène à postuler que le signal de dépolarisation est susceptible d'être généré par le passage d'une onde de pression hydraulique dans le xylème, elle-même induite par la flexion de la tige (Lopez *et al.* 2014, Louf *et al.* 2017) ce qui serait cohérent avec la Squeeze Cell Hypothesis appliquée à une flexion (Farmer *et al.* 2014, Choi *et al.* 2016). Ces résultats ouvrent de nombreuses nouvelles perspectives de recherches. En premier lieu, il s'agirait d'approfondir la caractérisation du signal de dépolarisation observé après la flexion de la tige.

Une certaine hétérogénéité a été remarquée dans l'amplitude que peut présenter le signal de dépolarisation. L'amplitude du signal pourrait dépendre : 1) de la déformation appliquée à la tige lors de la flexion, 2) de la vitesse de flexion, 3) de la rigidité de la tige, 4) ainsi que de l'état de repos de la plante. L'effet de la déformation sur l'amplitude du signal peut être étudié en faisant varier le rayon de courbure des gabarits sur lesquels les tiges sont fléchies. Etudier la vitesse de flexion pose en revanche un peu plus de difficultés techniques puisqu'il demande la mise en place d'un système permettant de moduler la vitesse de flexion avec comme condition de ne pas perturber électro-magnétiquement le dispositif de mesure d'électrophysiologie. Pour évaluer l'impact de la rigidité de la tige, il est envisageable de renouveler des mesures d'électrophysiologies sur des peupliers d'âges différents possédant donc des tiges de rigidités variées. L'amplitude de l'onde de pression hydraulique après flexion est régulée par ces paramètres. Si l'amplitude du signal de dépolarisation dépend elle aussi de ces paramètres alors cela pourra conforter l'hypothèse d'un signal électrique généré par un signal hydraulique lors d'une flexion.

Dans ce travail, la distance maximale que pouvait atteindre le signal de dépolarisation n'a pas été étudiée. Les résultats montrent une atténuation assez rapide de l'amplitude du signal. Pour être considéré comme un vecteur de l'information mécano-perçue, le signal de dépolarisation doit être susceptible de parcourir de longues distances à travers les organes. De nouvelles mesures d'électrophysiologie devront être menées, en multipliant le nombre d'électrodes insérées dans la tige, pour évaluer à la fois la distance que le signal parcourt et estimer avec une plus grande précision sa vitesse de propagation.

Dans un second temps, il pourrait être envisagé de faire un suivi de la cinétique d'expression de marqueurs de la voie des jasmonates dans les cellules de parenchyme du xylème en réponse à une flexion, à distance et à proximité de la zone de flexion. Cela permettrait de tester l'hypothèse de la 'Squeeze Cell Hypothesis' (Farmer *et al.* 2014) appliquée à un cas de flexion.

Une troisième piste de recherche pourrait concerner la question de la génécité du signal, de sa variabilité intra et interspécifique.

Enfin, une dernière proposition serait de mener une étude de la réponse moléculaire à une flexion de la tige dans la zone apicale dans laquelle un signal électrique et éventuellement hydraulique auraient été mesurés. La flexion ayant pour conséquence un arrêt de la croissance primaire, il serait intéressant de tester des cinétiques d'expression de marqueurs moléculaires de croissance, des marqueurs de divisions cellulaires et/ou des marqueurs d'élongation.

Références Bibliographiques

- Alarcon J-J, Malone M (1994) Substantial hydraulic signals are triggered by leaf-biting insects in tomato. *J Exp Bot* 45:953–957. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/45.7.953>
- Almeras T, Costes E, Salles J (2004) Identification of Biomechanical Factors Involved in Stem Shape Variability between Apricot Tree Varieties. *Ann Bot* 93:455–468. <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mch054>
- Boari F, Malone M (1993) Wound-induced hydraulic signals: Survey of occurrence in a range of species. *J Exp Bot* 44:741–746. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/44.4.741>
- Braam J (2004) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* 165:373–389. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2004.01263.x>
- Canny MJ (1993) The Transpiration Stream in the Leaf Apoplast: Water and Solutes. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 341:87–100. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1993.0094>
- Chauvin A, Caldelari D, Wolfender J-L, Farmer EE (2013) Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol* 197:566–575. <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.12029>
- Cheeseman JM, Pickard BG (1977) Depolarization of cell membranes in leaves of *Lycopersicon* by extract containing Ricca's factor. *Can J Bot* 55:511–519. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b77-061>
- Choi W-G, Hilleary R, Swanson SJ, Kim S-H, Gilroy S (2016) Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 67:287–307. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-043015-112130>
- Coutand C (2010) Mechanosensing and thigmomorphogenesis, a physiological and biomechanical point of view. *Plant Sci* 179:168–182. <https://www-sciencedirect-com.sicd.clermont-universite.fr/science/article/pii/S0168945210001263>
- Coutand C, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B (2008) Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Ann Bot* 101:1421–1432. <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcn054>

- Coutand C, Julien JL, Moulia B, Mauget JC, Guitard D (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *J Exp Bot* 51:1813–1824. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jexbot/51.352.1813>
- Coutand C, Moulia B (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *J Exp Bot* 51:1825–1842. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jexbot/51.352.1825>
- Crouzet J (2002) Caractérisation physiologique et moléculaire de l'effet d'une sollicitation mécanique chez le noyer (*Juglans regia*). DEA. DEA
- Dahse I, Müller E, Liebermann B, Eichhorn M (1988) The Membrane Potential as Indicator for Transport and Energetic Processes of Leaf Cells of the Aquatic Plant *Egeria densa*. *Biochem und Physiol der Pflanz* 183:59–66. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015379688800702>
- Depege N, Thonat C, Coutand C, Julien J-L, Boyer N (1997) Morphological Responses and Molecular Modifications in Tomato Plants after Mechanical Stimulation. *Plant Cell Physiol* 38:1127–1134. <https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029097>
- Erner Y, Jaffe MJ (1983) Thigmomorphogenesis: membrane lipid and protein changes in bean plants as affected by mechanical perturbation and Ethrel. *Physiol Plant* 58:197–203. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04169.x>
- Evans MJ, Morris RJ (2017) Chemical agents transported by xylem mass flow propagate variation potentials. *Plant J* 91:1029–1037.
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta IF (2014) The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytol* 204:282–288. <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.12897>
- Felle H (1987) Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: A study carried out with double-barrelled pH micro-electrodes. *J Exp Bot* 38:340–354. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/38.2.340>
- Fromm J, Bauer T (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J Exp Bot* 45:463–469. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/45.4.463>
- Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ* 30:249–257. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x>

- Graham JS, Hall G, Pearce G, Ryan CA (1986) Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* 169:399–405.
<http://link.springer.com/10.1007/BF00392137>
- Green TR, Ryan CA (1973) Wound-induced Proteinase Inhibitor in Tomato Leaves: Some Effects of Light and Temperature on the Wound Response. *Plant Physiol* 51:19–21.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16658283>
- Hallé F (2004) *Eloge de la plante: pour une nouvelle biologie*. Seuil.
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Eloge+de+la+plante+:+Pour+une+nouvelle+biologie#0>
- Haswell ES, Phillips R, Rees DC (2011) Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? *Structure* 19:1356–1369.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212611003169>
- Houwink AL (1935) The Conduction of Excitation in *Mimosa pudica*. *Recl des Trav Bot néerlandais* 32:51–91. <http://natuurtijdschriften.nl/search?identifier=552269>
- Iida H, Furuichi T, Nakano M, Toyota M, Sokabe M, Tatsumi H (2014) New candidates for mechano-sensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis thaliana* Legué V (ed). *Plant Biol* 16:39–42. <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12044>
- Jaffe MJ (1973) Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* 114:143–157.
<http://link.springer.com/10.1007/BF00387472>
- Jaffe MJ (1980) Morphogenetic Responses of Plants to Mechanical Stimuli or Stress. *Bioscience* 30:239–243. <https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.2307/1307878>
- Jaffe MJ, Leopold AC, Staples RC (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *Am J Bot* 89:375–382. <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.89.3.375>
- Julien J (1993) *Caractérisation électrophysiologique de l'onde de dépolarisation déclenchée par un traumatisme chez *bidens pilosa* l.* <http://www.theses.fr/1993CLF21493>
- Kern KA, Ewers FW, Telewski FW, Koehler L (2005) Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiol* 25:1243–1251.
- Kurkdjian A, Guern J (1989) Intracellular pH: Measurement and Importance in Cell Activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:271–303.
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.40.060189.001415>

- Lang RD, Volkov AG (2008) Solitary waves in soybean induced by localized thermal stress. *Plant Signal Behav* 3:224–228.
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.3.4.5586>
- Larson PR (1965) Stem form of young larch as influenced by wind and pruning. *For Sci* 11:412–424.
<http://www.ingentaconnect.com/content/saf/fs/1965/00000011/00000004/art00008>
- Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moullia B, Julien JL (2008) Jr-ZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant, Cell Environ* 31:715–726.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2008.01785.x>
- Lopez R, Badel E, Peraudeau S, Leblanc-Fournier N, Beaujard F, Julien J-L, Cochard H, Moullia B (2014) Tree shoot bending generates hydraulic pressure pulses: a new long-distance signal? *J Exp Bot* 65:1997–2008. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eru045>
- Louf J-F, Guéna G, Badel E, Forterre Y (2017) Universal poroelastic mechanism for hydraulic signals in biomimetic and natural branches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:11034–11039. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28973910>
- Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J Membr Biol* 72:43–58. <http://link.springer.com/10.1007/BF01870313>
- Maathuis FJ, Ichida AM, Sanders D (1997) Roles of Higher Plant K⁺ Channels'. *Plant Physiol* 114:1141–1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158406/pdf/1141141.pdf>
- Malone M (1993) Hydraulic Signals. *Philos Trans R Soc London Ser B-Biological Sci* 341:33–39.
- Malone M (1996) Rapid, Long-distance Signal Transmission in Higher Plants. *Adv Bot Res* 22:163–228. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229608600580>
- Malone M, Alarcon J-J (1995) Only xylem-borne factors can account for systemic wound signalling in the tomato plant. *Planta* 196:740–746.
<http://link.springer.com/10.1007/BF01106769>
- Malone M, Alarcon JJ, Palumbo L (1994) An hydraulic interpretation of rapid, long-distance wound signalling in the tomato. *Planta* 193:181–185.

- Malone M, Stankovic B (1991) Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves following localized wounding by heat. *Plant Cell Environ* 14:431–436.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1991.tb00953.x>
- Marre E (1979) Fusicoccin: A Tool in Plant Physiology. *Annu Rev Plant Physiol* 30:273–288.
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.30.060179.001421>
- Marrè E, Ballarin-Denti A (1985) The proton pumps of the plasmalemma and the tonoplast of higher plants. *J Bioenerg Biomembr* 17:1–21.
<http://link.springer.com/10.1007/BF00744985>
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 21:2341–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654264>
- Monshausen GB, Haswell ES (2013) A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *J Exp Bot* 64:4663–4680.
<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ert204>
- Morizet J, Mingeau M (1976) Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients. *Ann Agron* 27:183–205.
- Moulià B, Combes D (2004) Thigmomorphogenetic acclimation of plants to moderate winds greatly affects height structure in field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.), an indeterminate herb. *Comp Biochem Physiol - Part A Mol Integr Physiol* 137:77.
- Moulià B, Coutand C, Lenne C (2006) Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: implications for mechanical modeling of plant architecture. *Am J Bot* 93:1477–1489. <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.93.10.1477>
- Moulià B, Der Loughian C, Bastien R, Martin O, Rodríguez M, Gourcilleau D, Barbacci A, Badel E, Franchel G, Lenne C, Roeckel-Drevet P, Allain JM, Frachisse JM, de Langre E, Coutand C, Fournier-Leblanc N, Julien JL (2011) Integrative Mechanobiology of Growth and Architectural Development in Changing Mechanical Environments. In: Springer, Berlin, Heidelberg, pp 269–302. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19091-9_11
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500:422–426.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature12478>
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Neel PL, Harris RW (1971) Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar. *Science* 173:58–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17747314>
- Neumann PM (2007) Evidence for long-distance xylem transport of signal peptide activity from tomato roots. *J Exp Bot* 58:2217–2223. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erm081>
- Peraudeau S (2011) Propagation d'onde hydraulique et signalisation longue distance chez l'arbre. UCA
- Pickard BG (1971) Action potentials resulting from mechanical stimulation of pea epicotyls. *Planta* 97:106–115. <http://link.springer.com/10.1007/BF00386758>
- Pickard BG (1973) Action potentials in higher plants. *Bot Rev* 39:172–201.
<http://link.springer.com/10.1007/BF02859299>
- Pruyn ML, Ewers BJ, Telewski FW (2000) Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiol* 20:535–540.
<https://academic.oup.com/treephys/article-lookup/doi/10.1093/treephys/20.8.535>
- Raschke K (1970) Stomatal Responses to Pressure Changes and Interruptions in the Water Supply of Detached Leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 45:415–23.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16657326>
- Ricca U (1916) Solution d'un problème de physiologie: la propagation de stimulus dans la Sensitive. Résumé de l'Auteur. *Arch Ital Biol* 65:219–232.
<http://www.architalbiol.org/aib/article/view/65219>
- Roblin G, Bonnemain J-L (1985) Propagation in *Vicia faba*; Stem of a Potential Variation Induced by Wounding. *Plant Cell Physiol* 26:1273–1283.
<https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077027>
- Sambeek JW Van, Pickard BG (1976) Mediation of rapid electrical, metabolic, transpirational, and photosynthetic changes by factors released from wounds. III. Measurements of CO₂ and H₂O flux. *Can J Bot* 54:2662–2671.
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b76-286>
- Sanderson JB (1872) Note on the Electrical Phenomena Which Accompany Irritation of the Leaf of *Dionaea muscipula*. *Proc R Soc London* 21:495–496.
<http://rspl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspl.1872.0092>

- Schonknecht G, Bauer CS, Simonis W (1998) Light-dependent signal transduction and transient changes in cytosolic Ca²⁺ in a unicellular green alga. *J Exp Bot* 49:1–11. <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/49.318.1>
- Schopfer P (2006) Biomechanics of plant growth. *Am J Bot* 93:1415–1425. <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.93.10.1415>
- Sibaoka T (1953) Some aspects on the slow conduction of stimuli in the leaf of *Mimosa pudica*. *Sci Rep Tohoku Univ* 20:72–88.
- Sibaoka T (1969) Physiology of Rapid Movements in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 20:165–184. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.20.060169.001121>
- Slayman CL (1965) Electrical properties of *Neurospora crassa*. Respiration and the intracellular potential. *J Gen Physiol* 49:93–116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5862508>
- Spanswick RM (1981) Electrogenic Ion Pumps. *Annu Rev Plant Physiol* 32:267–289. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.32.060181.001411>
- Stahlberg R, Cleland RE, Van Volkenburgh E (2005) Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in *Helianthus annuus* L. shoots. *Planta* 220:550–558.
- Stahlberg R, Cosgrove DJ (1994) Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are a result of wounding. *Plant Cell Environ* 17:1143–1151.
- Stahlberg R, Cosgrove D (1996) Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* 200:416–425. <http://link.springer.com/10.1007/BF00231397>
- Stahlberg R, Cosgrove DJ (1997) The Propagation of Slow Wave Potentials in Pea Epicotyls. *Plant Physiol* 113:209–217.
- Stanković B, Davies E (1997) Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta* 202:402–406. <http://link.springer.com/10.1007/s004250050143>
- Stankovic B, Witters DL, Zawadzki T, Davies E (1998) Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol Plant* 103:51–58. <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.1998.1030107.x>

- Sukhov V, Nerush V, Orlova L, Vodeneev V (2011) Simulation of action potential propagation in plants. *J Theor Biol* 291:47–55.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519311004759>
- Tabata T, Sibaoka T (1987) Conduction Velocity and Blockage of Action Potential in *Chara*; Internodal Cells. *Plant Cell Physiol* 28:1187–1194.
<https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077405>
- Telewski FW (1989) Structure and function of flexure wood in *Abies fraseri*. *Tree Physiol* 5:113–121. <https://academic.oup.com/treephys/article-lookup/doi/10.1093/treephys/5.1.113>
- Telewski FW (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am J Bot* 93:1466–1476. <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.93.10.1466>
- Telewski FW, Jaffe MJ (1986) Thigmomorphogenesis: Field and laboratory studies of *Abies fraseri* in response to wind or mechanical perturbation. *Physiol Plant* 66:211–218.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1986.tb02411.x>
- Tixier A, Badel E, Franchel J, Lakhil W, Leblanc-Fournier N, Moullia B, Julien J-L (2014) Growth and molecular responses to long-distance stimuli in poplars: bending vs flame wounding. *Physiol Plant* 150:225–237. <http://doi.wiley.com/10.1111/ppl.12089>
- Umrath K (1930) Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Characeen. *Protoplasma* 9:576–597. <http://link.springer.com/10.1007/BF01943373>
- Wendler S, Zimmermann U, Bentrup F-W (1983) Relationship between cell turgor pressure, electrical membrane potential, and chloride efflux in *Acetabularia mediterranea*. *J Membr Biol* 72:75–84. <http://link.springer.com/10.1007/BF01870315>
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360:62–65.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/360062a0>
- Yi K, Guo C, Chen D, Zhao B, Yang B, Ren H (2005) Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138:1071–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923338>
- Zawadzki T, Davies E, Dziubinska H, Trebacz K (1991) Characteristics of action potentials in *Helianthus annuus*. *Physiol Plant* 83:601–604. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02475.x>
- Zimmermann U, Beckers F (1978) Generation of action potentials in *Chara corallina* by turgor pressure changes. *Planta* 138:173–179.

