



HAL
open science

Propagation d'onde hydraulique et signalisation longue distance chez l'arbre

Sébastien Peraudeau

► **To cite this version:**

Sébastien Peraudeau. Propagation d'onde hydraulique et signalisation longue distance chez l'arbre. [Stage] Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2) (UBP), FRA. 2011, 31 p. hal-02803369

HAL Id: hal-02803369

<https://hal.inrae.fr/hal-02803369>

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 et Environnement
SPECIALITE : Génomique, Ecophysiologie et Production Végétale

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR :

PERAUDEAU Sébastien

SUJET :

**Propagation d'onde hydraulique et signalisation longue distance
chez l'arbre**

Responsables de stage : BADEL Eric et LEBLANC-FOURNIER Nathalie

INRA Site de Crouël
234, av du Brézet
63100 Clermont-Fd – France
Tél : +33 4 73 62 43 73
Fax : + 33 4 73 62 44 54



Juin 2011

Résumé

L'ensemble des réponses des plantes aux sollicitations mécaniques est appelé « thigmomorphogénèse » et se traduit d'une manière générale par une diminution du rapport hauteur/diamètre. Chez un hybride de peuplier (*Populus tremula x alba*) nous avons pour la première fois mis en évidence la génération et la propagation d'une onde de pression hydraulique importante dans le xylème de la tige, suite à une flexion. Les caractéristiques de cette onde évoluent selon la vitesse de flexion et le niveau de déformation imposé. Les analyses d'expressions moléculaires de gènes connus pour être impliqués dans la croissance primaire et/ou exprimés à distance suite à un stimulus et/ou exprimés localement suite à une flexion, ont été réalisées par PCR semi-quantitative au niveau de la zone fléchie ou à distance. Une mise sous pression interne de la tige, sans déformation macroscopique des tissus, induit une surexpression des gènes *Pta-ACS6* et *Pta-ACO1*, et une inhibition de l'expression du gène *Pta-Gidl*. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de variations significatives de l'expression de ces gènes suite à une flexion, même si certaines tendances, similaires aux résultats de mise sous pression, ont été observées. Ces travaux ouvrent des pistes de recherche prometteuses sur des mécanismes de transport d'information longue distance.

Mot clefs : thigmomorphogénèse, signalisation longue distance, *Populus tremula x alba*, *Pta-ACS6*, *Pta-Gidl*.

Abstract

Thigmomorphogenesis defines the whole plant responses to mechanical stress that usually results by a decrease in the height to diameter ratio. In hybrid poplar (*Populus tremula x alba*) we have demonstrated that the bending of a stem region increase hydraulic pressure that propagates along the stem. The characteristics of this hydraulic wave varie according to the bending speed and the level of mechanical strain. We studied the levels of transcripts for genes that are implicated in primary growth and/or express after mechanical stress and/or express locally after stem bending by real time PCR. We enlightened that internal pressurization of the stem causes an increase of transcripts level for genes *Pta-ACS6* and *Pta-ACO1*, and inhibition for gene *Pta-Gidl*. After stem bending, we did not measure significant variations of transcripts level for this same genes. However, similar trends were observed. Nevertheless, this work gives new promising elements for the study of long distance signaling.

Key words : thigmomorphogenesis, long-distance signaling, *Populus tremula x alba*, *Pta-ACS6*, *Pta-Gidl*.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis Julien et Thierry Ameglio pour m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'étude au sein de l'UMR PIAF.

Je tiens à adresser mes remerciements à Eric Badel et Nathalie Leblanc-Fournier. Je vous remercie pour votre implication dans les expérimentations et dans le rapport. Je vous remercie aussi pour la confiance dont vous avez fait preuve lors de votre départ en vacance. J'espère ne pas vous avoir fait trop stresser pour le rendu du rapport final, on était large.

Je remercie aussi François Beaujard pour ses conseils toujours pertinents et l'aide apporté aux expérimentations, Boris Adam pour la réalisation du programme informatique, Brigitte Girard pour le soin apporté aux peupliers et les broyages ainsi qu'André Lacoïnte pour son aide précieuse en analyse statistique.

Merci à Jérôme Franchel et David Lopez pour leurs conseils avisés en biologie moléculaire.

Je n'oublierais pas de remercier Christian Bodet pour toute l'aide qu'il m'a apporté pour les mises sous pression. Merci à toi, tu as été d'une aide précieuse. Les bulles et les fuites n'ont plus de secret pour toi. Ton optimisme me manquera.

Un grand merci à Anne-Emilie qui a partagé mon bureau tout au long de ce stage. Merci à toi pour le prélèvement des tiges et les divers conseils que tu m'as apporté pour le rapport.

Enfin, mes derniers remerciements sont pour l'ensemble de l'équipe, au sein de laquelle il règne une ambiance chaleureuse. Je remercie tout particulièrement Pascal pour son initiation aux fléchettes, Stéphane pour sa convivialité et l'ensemble des stagiaires entassés dans le bureau commun.

Merci à tous.

Liste des abréviations

ACO : 1-aminocyclopropane-1-carboxylique oxydase

ACS : 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthétase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANOVA : ANalyse Of VAriance

ARN : Acide RiboNucléique

ARR : Arabidopsis Respons Regulator

BC : Bois en Compression

BT : Bois en Tension

Ct : Cycle Threshold

CTAB : CeTyltrimethylAmmonium Bromide

EC : Ecorce en Compression

ET : Ecorce en Tension

EXP : Expansine

IAA : Indole-3-acetic acid

JAZ : JAsonate Zim domain protein

PCR : Polymerase Chain Reaction

Qr : Quantité Relative de transcripts

TCH : TouCH

ZFP : Zinc Finger Protein

Sommaire

Introduction.....	1
1. Bibliographie	3
1.1. Réponses physiologiques aux stimuli mécaniques.....	3
1.2. Réseau de perception des stimuli mécaniques.....	4
1.3. Réponses moléculaires.....	5
1.3.1. Régulation des gènes au niveau de la zone fléchie	5
1.3.2. Régulation à distance des gènes dans les organes en croissance primaire	7
1.4. Signalisation longue distance	8
1.5. Objectifs de l'étude	10
2. Matériels et Méthodes.....	11
2.1. Mise en évidence d'une propagation d'onde hydraulique dans le système vasculaire xylémien lors d'une flexion de tige	11
2.1.1. Matériel végétal	11
2.1.2. Mesures de pression	11
2.1.3. Flexion contrôlée.....	12
2.1.3.1. Niveau de déformation	12
2.1.3.2. Vitesse de flexion.....	12
2.1.3.3. Flexion des portions de tige	13
2.2. Réponses moléculaires dans la zone en croissance de tiges de peuplier après mise sous pression des plants ou suite à une flexion	13
2.2.1. Mise sous pression	13
2.2.2. Flexion des tiges	14
2.2.3. Prélèvements pour les analyses de biologie moléculaire	14
2.3. Réponse moléculaire locale après flexion.....	14
2.3.1. Niveau de déformation.....	14
2.3.2. Prélèvement pour la biologie moléculaire	15
2.4. Analyses d'expressions géniques	15
2.4.1. Extraction d'ARNs.....	15

2.4.2.	Synthèse d'ADNc	15
2.4.3.	PCR semi quantitative en temps réel	15
2.5.	Analyses statistiques	16
3.	Résultats	17
3.1.	Mise en évidence de la propagation d'une onde hydraulique dans le système vasculaire xylémien lors d'une flexion de tige	17
3.1.1.	Caractérisation de l'onde hydraulique	17
3.1.2.	Influence de la vitesse de flexion	18
3.1.3.	Influence du niveau de déformation	19
3.1.4.	Voie de propagation de l'onde hydraulique.....	19
3.2.	Mise en évidence d'une montée en pression de la colonne d'eau après mise sous pression du système racinaire	20
3.3.	Réponses moléculaires, locale et à distance, suite à une flexion ou une mise sous pression des plantes	20
3.3.1.	Variation de l'expression locale du gène Pta-ZFP2 chez des peupliers cultivés en pot suite à une flexion	20
3.3.2.	Variation de l'expression à distance de gènes mécanosensibles et/ou impliqués dans la croissance primaire suite à une flexion ou une mise sous pression	21
3.3.2.1.	Caractéristiques de la pression et de la flexion appliquées aux plantes	21
3.3.2.2.	Variation de l'expression des gènes étudiés	22
4.	Discussion.....	23
4.1.	Propagation d'une onde hydraulique suite à une flexion	23
4.2.	Variations d'expressions géniques	24
5.	Conclusion et perspectives.....	26
	Références bibliographiques.....	27

Introduction

Contrairement au monde animal, les plantes n'ont pas la capacité de changer d'environnement en se déplaçant. Elles n'ont d'autres solutions que de s'acclimater rapidement lorsqu'elles subissent des stress extérieurs. Ceux-ci peuvent être d'origines multiples : hydrique, thermique, nutritionnel, physique... Ceux qui nous intéressent dans cette étude sont qualifiés de mécanique. L'observation des réponses à ces perturbations mécaniques est née en 1881, époque à laquelle Darwin a montré que les racines croissent à l'opposé du point de contact qu'elles subissent. Ce n'est cependant qu'en 1973 que le terme de thigmomorphogénèse est introduit dans la littérature par Jaffe. Ce terme décrit les réponses morphologiques, physiologiques et biochimiques des plantes à un stimulus mécanique. Ces sollicitations peuvent être d'origines biotique ou abiotique et génèrent des réponses observables à l'échelle de la plante. Ce type de stimulation peut être un stress extrême subi par la plante ou une nécessité vitale, notamment pour les plantes carnivores qui utilisent les stimuli mécaniques pour saisir leur proie. A titre d'exemple, une sollicitation mécanique au niveau des lobes de *Dionaea muscipula* induit un potentiel d'action et ainsi génère un signal électrique (Volkov *et al.*, 2008) provoquant la fermeture rapide des lobes.

Chez les ligneux l'influence des stimuli mécaniques est très importante car ils rythment la croissance lente et longue des arbres. Dans un arbre, les variations de pression de turgescence au sein d'un tissu en croissance ou la mise en place de fruits, par exemple, induisent des sollicitations mécaniques internes dites « lentes » par rapport à la croissance. Sous l'effet de la gravité, la masse propre des arbres devient elle aussi une sollicitation mécanique à prendre en compte afin que leur architecture aérienne ne s'affaisse pas. Outre ces sollicitations, il existe des signaux externes, comme le vent mais aussi les courants marins pour les plantes aquatiques, provoquant des flexions ou des torsions de plantes. D'autres signaux, liés au « toucher », ont une influence majeure dans le développement végétal ; c'est le cas des interventions humaines, des passages d'animaux et de l'impact de la pluie, par exemple. Ces signaux externes sont dits « rapides » par rapport à la croissance des ligneux et obligent ces derniers à adapter leur développement. La haute fréquence de ce type de stress en milieu naturel, oblige les végétaux à s'accommoder c'est-à-dire à diminuer leur sensibilité, pour ne pas réduire trop fortement leur croissance primaire (Martin *et al.*, 2010).

A l'heure actuelle, les réponses physiologiques des plantes aux sollicitations mécaniques rapides telles que le vent sont relativement bien connues. De plus, des études ont été menées,

ces dernières années, au sein de l'UMR PIAF, pour faire la lumière sur les mécanismes moléculaires sous jacents à ces réponses. Par exemple, l'identification du gène mécanosensible ZFP2, codant pour un facteur de transcription, a permis de mieux appréhender les étapes précoces de la mécanoperception au niveau local. La majorité des études n'ont été effectuées que localement, au niveau de la zone fléchie, c'est-à-dire sur des entrenœuds ayant terminé leur croissance longitudinale. Concernant la croissance primaire, les mécanismes de transmission du signal à longue distance, de la zone stressée à la zone d'élongation, sont encore méconnus. Ainsi, ni le vecteur de l'information, ni les acteurs moléculaires en jeu, n'ont été identifiés à ce jour. De plus, l'étude des phénomènes physiques (potentiel d'action, onde lente, déformation cellulaire) liés à la flexion d'une tige n'a, à notre connaissance, jamais permis d'identifier le vecteur de l'information longue distance de ce stress.

Avant de présenter les résultats obtenus lors de ce stage, une synthèse bibliographique dressera l'état actuel des connaissances sur les réponses phénotypiques et physiologiques après une flexion de tige ainsi que sur la signalisation longue distance. Au terme de cet état de l'art, les objectifs de l'étude seront présentés. Suivront ensuite les matériels et méthodes utilisés, puis les résultats obtenus et la discussion associée.



Figure 1 : Port en drapeau suite à de forts vents unidirectionnels. (<http://www.planete-svt.fr>)

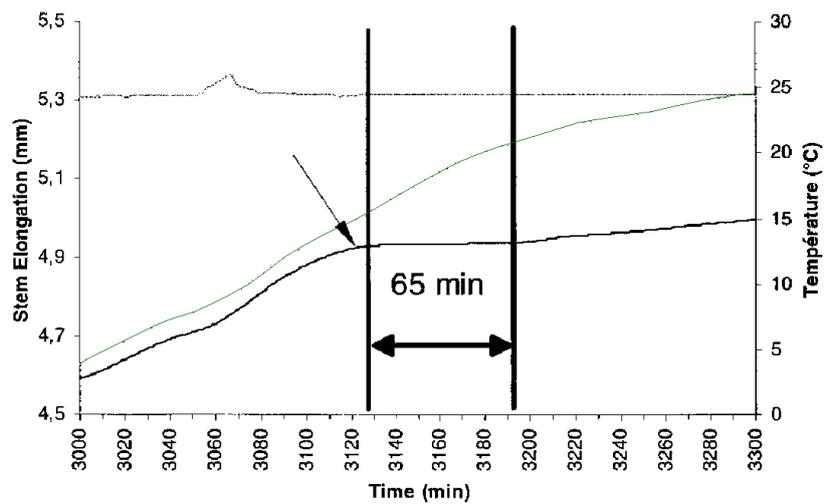


Figure 2 : Cinétique d'élongation d'une tige de tomate. La courbe verte représente la croissance longitudinale du plant témoin et la courbe noire celle d'un plant subissant une flexion. La flèche représente le moment de la flexion et les deux barres noires délimitent l'arrêt d'élongation de la tige du plant de tomate fléchi (D'après Coutand *et al.*, 2000).

1. Bibliographie

1.1. Réponses physiologiques aux stimuli mécaniques

Le vent est l'un des principaux stimuli mécaniques. En effet, son intensité et sa fréquence en font le stress mécanique le plus couramment ressenti dans la nature avec la gravité (Coutand, 2010 review). Il entraîne d'une part le dessèchement des bourgeons exposés qui peut conduire à un port en drapeau (Figure 1) dans le cas de vents forts unidirectionnels (Telewski, 2006) et d'autre part à la flexion de la tige des plantes. Cette flexion pouvant être reproduite en laboratoire suscite de nombreux travaux.

L'effet du vent ou d'une flexion affecte différentes activités cellulaires aux conséquences diverses telles que la modification de la croissance et de la conductance hydraulique, le blocage du phloème, la perte de feuilles, la réallocation de biomasse, la modification des propriétés mécaniques (Telewski, 2006). En 1994, Gartner a montré que des plants de tomates (*Lycopersicon esculentum*) fléchis 1 minute par jour durant 6 semaines ont la même biomasse que des plantes témoins mais l'allouent préférentiellement au système racinaire plutôt qu'à la partie aérienne. Les mêmes constatations ont été faites chez *Capsella bursa-pastoris* subissant 60 secondes de vibration par jour (Niklas, 1998).

L'effet de la flexion sur les plantes est surtout étudié pour son impact sur les croissances primaire et secondaire. Dès 1803, Knight montre que les pommiers exposés au vent ont une croissance radiale plus importante que ceux protégés du vent. De plus, chez la tomate, la flexion des entrenœuds basaux (matures) inhibe la croissance primaire de la plante durant 65 min, ce qui a pour effet de diminuer le rapport hauteur/diamètre et suggère la présence d'une signalisation longue distance (Figure 2, Coutand *et al.*, 2000). Après 65 min, on observe une reprise progressive de la croissance longitudinale, sans compensation, expliquant ainsi la plus faible taille des plants de tomate fléchis (Coutand *et al.*, 2000). Cependant, l'effet du vent sur la croissance primaire n'est pas évident du fait de l'existence d'une grande variabilité de réponses inter- (Coutand *et al.*, 2010) et intraspécifique (Pruyn *et al.*, 2000).

Contrairement à la croissance primaire, il est couramment observé une augmentation de la croissance secondaire de la tige après flexion (Pruyn *et al.*, 2000). Dès 1954, Jacobs montre que les arbres exposés au vent ont un diamètre à la base du tronc supérieur de 36% à celui des arbres à l'abri. Le bois nouvellement formé en réponse à la flexion, comporte un nombre plus faible de vaisseaux avec des diamètres plus petits qui confèrerait au bois de peuplier stressé

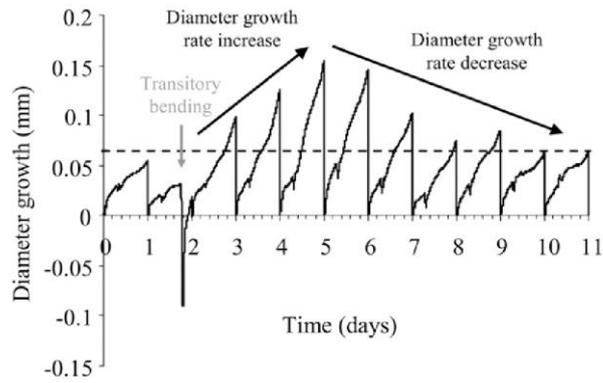


Figure 3 : Effet d'une flexion transitoire sur la croissance radiale d'une tige de *Populus tremula x alba*. L'application de la flexion transitoire est matérialisée par la flèche grise (D'après Coutand *et al.*, 2009)

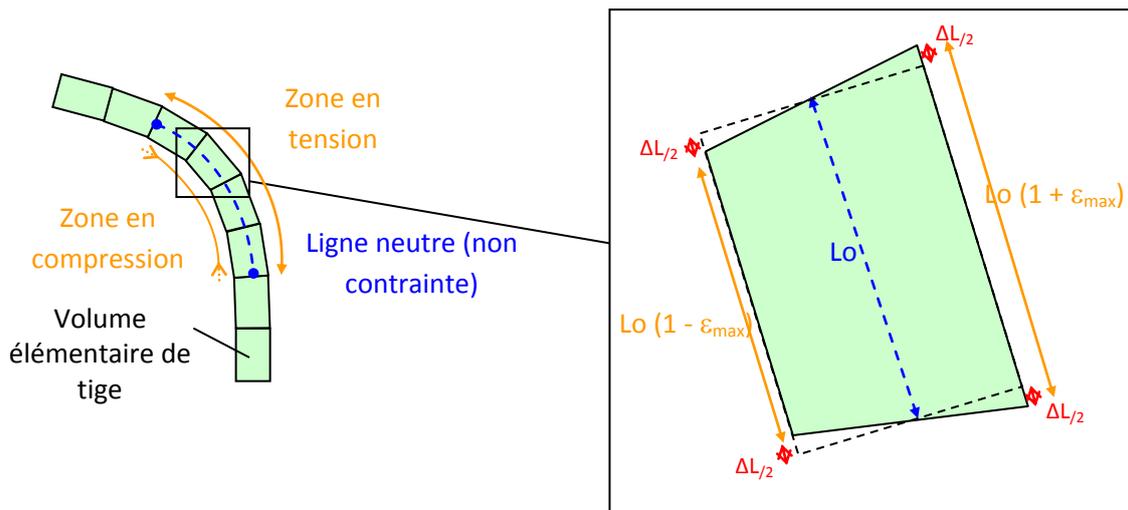


Figure 4 : Déformations locales dans une tige en flexion. L_0 est la longueur initiale du tissu ; ΔL est l'allongement ou le raccourcissement du tissu durant la flexion ; ϵ_{max} est l'allongement (raccourcissement) relatif (ou déformation) maximum à la périphérie de la tige : $\epsilon = \Delta L / L_0$ (exprimée en %).

une rigidité mécanique plus importante (Kern *et al.*, 2005). Après une flexion transitoire de la tige de jeunes peupliers (*Populus tremula x alba*) on observe, comme pour la croissance primaire, un arrêt rapide et de courte durée de la croissance secondaire mais auquel succède deux à trois jours d'activité intense (Figure 3, Coutand *et al.*, 2009). Cette croissance secondaire soutenue est à l'origine de l'augmentation du diamètre observé après flexion qui contribue à la rigidification mécanique de la tige.

Cette réponse cambiale ne s'observe qu'à une échelle locale c'est-à-dire à l'endroit où est appliquée la flexion. Lors d'une flexion de tige, chaque élément de cette dernière est soumis à un moment de flexion qui entraîne la rotation de la section. Cette rotation de section induit d'un côté une élongation ($\Delta L > 0$) (zone en tension) et de l'autre un raccourcissement ($\Delta L < 0$) (zone en compression) des tissus (Figure 4). On définit alors la déformation (ε) comme étant l'allongement (ou le raccourcissement) relatif des tissus :

$$\varepsilon = \Delta L / L \quad \text{où } L \text{ est la longueur initiale du tissu considéré.}$$

A l'échelle de la plante, le niveau de déformation s'échelonne de $\varepsilon = 0$ sur la ligne neutre à ε_{\max} aux périphéries (Figure 4). Si on intègre chacune de ces déformations, sur toute la section de tige considérée, pour caractériser le traitement mécanique subi par la tige, on parle alors de « somme des déformations ». Coutand et Moulia (2000) ont montré que la somme des déformations longitudinales est la variable qui explique le mieux la durée de la réponse de croissance primaire chez la tomate. C'est ainsi que le modèle appelé « Sum-of-Strain-Sensing model » (S^3m) est né, permettant ainsi de quantifier les stimuli mécaniques, d'un niveau local (déformation) à la plante entière (somme des déformations) (Moulia *et al.*, 2011 sous-presse).

1.2. Réseau de perception des stimuli mécaniques

A l'instar des animaux, Jaffe et ses collaborateurs (2002) suggèrent qu'il existe, au sein des cellules végétales, une liaison entre les microtubules du cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (CPMCW : Cytoskeleton-Plasma Membrane-cell Wall). Celle-ci crée une continuité structurale dans la cellule qui serait à la base de la perception des stimuli mécaniques. Ils proposent que ce lien puisse être effectué par l'intermédiaire de protéines RGD à motif peptidique Arginine-Glycine-Asparagine.

Le réseau de mécano-perception liant les microtubules du cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire, met en jeu d'autres protéines telles que les formines (Michelot

et al., 2005 ; Yi *et al.*, 2005) et les myosines de classe VIII (Baluška and Hlavačka, 2005). Les formines auraient pour rôle de regrouper l'actine F (fibrillaire) tandis que les myosines de classe VIII seraient impliquées dans la synthèse de callose via une liaison transmembranaire avec une sous-unité de la callose synthase (Baluška *et al.*, 2003 ; Baluška and Hlavačka, 2005). Dès 1984, Jaffe et Telewski montrent que le dépôt de callose augmente dans le phloème de *Phaseolus vulgaris* et *Pinus taeda* une heure après avoir effectué un stimulus mécanique sur la tige. Les dépôts, en inhibant les communications entre cellules, seraient un des éléments de la mécanoperception (Sivaguru *et al.*, 2000).

Les différents niveaux de tension de la membrane cellulaire seraient d'autres éléments impliqués dans la mécanoperception. Lors d'une flexion, le côté supérieur de la tige subit une forte tension favorisant le phénomène d'exocytose. A l'inverse, le côté inférieur subit une faible tension favorisant l'endocytose (Morris and Homann, 2001). Ces résultats suggèrent que la réponse de la tige à une sollicitation mécanique pourrait varier selon la localisation cellulaire dans la tige.

A ce jour, les connaissances sur les mécanismes de la mécanoperception restent limitées. Plusieurs hypothèses se confrontent mais il semblerait qu'un stimulus mécanique puisse initier plusieurs voies de signalisation.

1.3. Réponses moléculaires

Un certain nombre de gènes sont actuellement reconnus pour leur implication dans la réponse aux sollicitations mécaniques des plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, 30 minutes après avoir replié légèrement une feuille de rosette vers l'arrière, Lee a observé que l'expression de 589 gènes est induite et que celle de 171 autres gènes est inhibée (Lee *et al.*, 2005). Devant l'abondance du nombre de gènes dont l'expression varie après une sollicitation mécanique, seuls les gènes les mieux caractérisés dans la littérature sont présentés plus finement lors de ce travail.

1.3.1. Régulation des gènes au niveau de la zone fléchie

- Les gènes TOUCH (TCH) ont été parmi les premiers identifiés chez *A. thaliana* (Braam et Davis, 1990). Certains d'entre eux (TCH1, 2, 3) codent pour des protéines de liaison au calcium : les calmodulines. Bien qu'il ait le même nom que les gènes TCH cités précédemment, le gène TCH4 ne code pas pour une calmoduline mais pour une

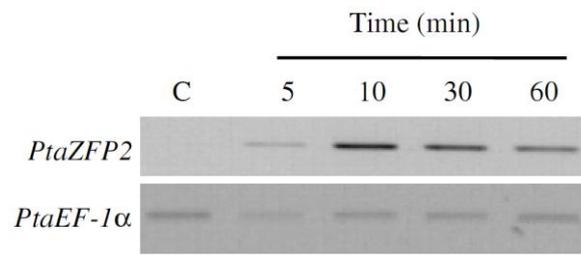


Figure 5 : Cinétique d'accumulation des transcrits *Pta-ZFP2* de la tige après flexion. Les ARNs totaux ont été extraits des tiges de plants témoins (C) et des tiges des plants stressés à différents temps (5, 10, 30 et 60 min) après flexion. Les variations d'abondances des ARNm de *Pta-ZFP2* ont été analysées par RT-PCR. L'expression du gène *Pta-EF-1α* sert de témoin. Adapté de Martin *et al.*, 2009.

xyloglucane endotransglycosylases/hydrolases, enzyme provoquant un clivage interne des polymères de xyloglucanes de la paroi (Xu *et al.*, 1995). Elle pourrait donc être impliquée dans l'expansion cellulaire via le réarrangement des chaînes de xyloglucanes. De plus, chez le peuplier, les gènes *Pta-TCH2* et *Pta-TCH4* sont induits très rapidement dans la portion de tige fléchie et sont donc d'un intérêt tout particulier lorsque l'on étudie l'effet d'une sollicitation mécanique (Martin *et al.*, 2009 et 2010).

- Le gène *ZFP2*, dans un premier temps isolé chez le noyer, code pour un facteur de transcription à deux doigts de zinc de la famille des Cys2/His2 (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Chez le peuplier, l'expression de *Pta-ZFP2* est induite rapidement (dès 5 min) et transitoirement après flexion de la tige (Figure 5, Martin *et al.*, 2009). Les travaux menés à l'UMR PIAF ont montré que l'expression de *Pta-ZFP2* est corrélée à la somme des déformations longitudinales subies par la plante et que son niveau d'expression varie suivant la fréquence des sollicitations mécaniques faisant ainsi de ce gène un bon marqueur de la mécanoperception (Coutand *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2010).
- L'éthylène est une hormone impliquée dans de nombreuses voies de réponses aux stress biotiques et abiotiques. Issue de la méthionine, l'éthylène est synthétisée via l'action successive de deux enzymes : l'ACC synthase (ACS) et l'ACC oxydase (ACO). Chez la tomate, la blessure et le toucher provoquent une expression rapide (dès 30 min) et transitoire du gène *ASC6* (Tatsuki and Mori, 1999). De la même manière, chez le peuplier on observe une accumulation locale de transcrits *Pta-ACS* dès 10 min après flexion de tige (Martin *et al.*, 2009). Chez le noyer, 30 min après une flexion de tige, on observe une accumulation locale de transcrits d'*ACO* (Crouzet, 2002). Tatsuki et Mori (1999) ont montré que la production d'éthylène augmente rapidement après une sollicitation mécanique de type toucher ou blessure. Ces résultats suggèrent un rôle important de cette hormone dans la réponse aux stimuli mécaniques et font des gènes *ACS* et *ACO* de bons candidats pour l'étude de cette voie de réponse.
- Les jasmonates sont impliquées dans de nombreux rôles physiologiques, de la croissance à la reproduction en passant par la sénescence par exemple. Elles sont aussi impliquées dans les réponses thigmomorphogénétiques. Une augmentation de la quantité de transcrit d'un gène codant une lipoxygénase (LOX), 1^{ère} enzyme de la voie de biosynthèse des jasmonates, est observée dans les plantules de *Triticum aestivum* ayant subi un stress mécanique (Mauch *et al.*, 1997). Chez le peuplier, Lakhali (2010) a montré que

Temps après l'application de la sollicitation mécanique	Réponses cellulaires	Réponses de croissance
1 à 10 s	Formation d'un potentiel d'action Ouverture des canaux mécanosensibles	
1 à 2 min	Entrée du Ca ²⁺ dans le cytosol Production d'espèces activées de l'oxygène Blocage du transport phloémien	
2 à 8 min	Expression des gènes <i>PtaZFP2</i> codant une protéine C2H2-ZFP et <i>PtaTCH2</i> codant une CML	Arrêt de la croissance cambiale et de la croissance longitudinale
10 à 30 min	Expression de gènes codant des calmodulines (TOUCH) Expression de gènes de la biosynthèse de l'éthylène (ACC synthase)	
30 min	Modification de l'expression de gènes codant des protéines du métabolisme	
30 à 60 min		Reprise progressive de la croissance longitudinale
1 à 2 h	Retour à l'expression de base des gènes <i>TOUCH</i> , <i>ACS6</i> et <i>PtaZFP2</i> Synthèse et dépôt de callose	
2 à 9h	Synthèse d'éthylène	
4 à 6 h		Reprise de la croissance radiale et augmentation de la division cellulaire au niveau du cambium
8 à 12 h		Retour à une croissance longitudinale normale
24 h	Retour au niveau initial d'éthylène et de callose	

Figure 6 : Chronologie des réponses cellulaires et physiologiques observées suite à une sollicitation mécanique. D'après Telewski, 2006, complété par Martin, 2009.

l'expression locale du gène *JAZ5* qui est régulé par les jasmonates et qui code pour un régulateur négatif de leur voie de signalisation, augmente dès 30 min après la flexion d'une tige faisant de *JAZ5* un gène mécanosensible intéressant à étudier.

En résumé, depuis quelques années, plusieurs équipes de chercheurs étudient la voie de signalisation des sollicitations mécaniques et leurs impacts sur le développement végétal. Comme le montre la figure 6, Telewski (2006) a proposé une première chronologie des réponses physiologique et moléculaires induites lors de stimuli mécaniques. Toutefois, aucune relation entre les différents acteurs, impliqués dans ces réponses, n'a été démontrée à ce jour.

1.3.2. Régulation à distance des gènes dans les organes en croissance primaire

Les acteurs moléculaires de la croissance primaire mis en jeu suite à une flexion de tige sont à l'heure actuelle peu étudiés. Afin d'en identifier certains, il semble intéressant de cibler quelques gènes potentiellement impliqués, à un quelconque niveau, dans la croissance primaire.

- Les gibbérellines sont des hormones liées à plusieurs aspects du développement des plantes, notamment la croissance des tiges et la formation du bois. Elles sont notamment connues, chez le peuplier, pour être impliquées dans la formation du xylème et l'élongation de ses fibres. En 2009, Mauriat et Moritz montrent que le gène *Pta-GID1.1*, codant pour un récepteur de gibbérellines, entraîne un accroissement des plantes et stimule l'activité cambiale. Par ailleurs, ils montrent que le gène *Pta-GA20ox*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des gibbérellines, stimule lui aussi l'activité cambiale et augmente la longueur des fibres. De part leur activité, ces deux gènes semblent intéressants pour étudier la voie des gibbérellines en réponse aux stimuli mécaniques.
- Les auxines sont, comme les gibbérellines, des hormones impliquées dans de nombreux aspects du développement végétal (rhizogénèse, dominance apicale, induction florale...). Mais c'est surtout son rôle dans l'élongation cellulaire et donc dans l'accroissement des plantes qui en fait, ici, une hormone d'intérêt. Moyle (2002), a montré que le gène *Pta-IAA1*, gène de réponse induit dès 5 min par l'auxine et codant pour un facteur de transcription, s'exprime entre autres dans le cambium, le xylème en division et dans les

entrecœuds de la tige en élongation. Il est donc susceptible d'être régulé à distance suite à une flexion.

- Dans les tubercules de pomme de terre, Mitchell et Vanstaden (1983) ont montré qu'une sollicitation mécanique entraîne une augmentation de la concentration et de l'activité des cytokinines suggérant ainsi un rôle de cette hormone. Chez le peuplier, le gène *Pta-ARR7*, gène primaire de réponse aux cytokinines, est connu pour être exprimé dans le xylème en division (Nieminen, 2008). L'étude de ce gène peut nous permettre de mettre en évidence une éventuelle augmentation de la concentration des cytokinines à la suite d'une sollicitation mécanique.
- Les gènes de la voie de biosynthèse de l'éthylène et de signalisation des jasmonates, précédemment présentés comme activés localement suite à un stimulus mécanique, sont aussi induits à distance dans le cadre de stimuli de type blessure. En effet, chez le peuplier, l'expression des gènes *Pta-JAZ5* et *Pta-ACS6* est stimulée dans l'apex dès 30 min après brûlure d'une feuille basale (Tixier, 2010). Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation de l'éthylène et des jasmonates pourrait avoir un rôle lors de la signalisation longue distance rapide dans le cadre d'une flexion.
- En plus des hormones, des facteurs de transcriptions et des enzymes, il existe d'autres types de protéines liées à l'élongation cellulaire qui pourraient être régulées à distance après une sollicitation mécanique. Les expansines, par exemple, jouent un rôle majeur dans l'extension des parois végétales en cassant les liaisons hydrogènes présentes entre l'hémicellulose et les microfibrilles de cellulose. Elles relâchent ainsi la tension pariétale qui peut dès lors s'étendre sous l'effet de la pression de turgescence. Gray-mitsumune (2004), a montré une forte activité des expansines dans la fraction phloème/cambium, notamment l'expansine EXP1. Celle-ci s'exprime aussi dans la partie en croissance de la tige ainsi que dans la zone radiale en expansion. L'étude de l'expression du gène *Pta-EXP1* paraît donc particulièrement intéressante.

1.4. Signalisation longue distance

Les mécanismes de communication longue distance chez les plantes sont d'une importance capitale car ils permettent une adaptation globale de l'individu à son environnement. Ils le sont d'autant plus chez les arbres où la signalisation doit se propager sur plusieurs mètres.

Plusieurs mécanismes s'inscrivent dans cette communication longue distance *via* le transport de substances chimiques par le xylème et le phloème, mais aussi les variations de pression hydraulique et de potentiel électrique. En plus de ces processus internes à la plante, il existe un système de communication aérien lié à des substances volatiles excrétées dans l'environnement extérieur. Ces messagers diffusent rapidement à l'aide des courants d'air environnant et peuvent atteindre des tissus éloignés ou même des plantes voisines (Farmer and Ryan, 1990).

Le phloème est un bon candidat pour la communication longue distance entre les différents organes de l'arbre. En effet, on y retrouve des messagers tels que l'acide abscissique, le méthyle jasmonate, l'acide salicylique et bien d'autres (Hall and Baker, 1972 cité par Malone, 1996). De plus, pour certains scientifiques, il est le seul système capable de transporter rapidement des solutés vers l'apex (transport acropète) et vers les racines (transport basipète). Cependant, il a été observé d'autres signaux longue distance plus lents ou plus rapides que la vitesse de circulation de la sève qui est comprise entre 0,1 et 4 mm.s⁻¹ (Malone, 1996). De surcroît, il existe de nombreux échanges entre les sèves brute et élaborée qui ne permettent pas de savoir si une molécule trouvée dans le phloème a uniquement été transportée par celui-ci. Enfin, certaines molécules « signal », comme les oligosaccharides, sont très peu mobiles dans le phloème (Baydoun and Fry, 1985). Ces données suggèrent que ce dernier n'est pas la seule voie de communication longue distance au sein des plantes.

Des substances chimiques transportées massivement dans le xylème pourraient être liées à une signalisation longue distance. Cependant, quelques limites apparaissent notamment à cause de la variabilité du flux xylémien, dépendant de la transpiration, au cours de la journée. Ainsi, pendant la nuit, lorsque la transpiration est réduite, les signaux chimiques produits dans les racines peuvent mettre plusieurs heures à atteindre le sommet de la plante (Malone, 1996). La vitesse de circulation de la sève xylémienne peut cependant dépasser largement le millimètre par seconde (Zimmermann and Brown, 1971 ; Nobel, 1991) et peut même atteindre 200 mm.s⁻¹ chez certaines herbacées (Zimmermann, 1983) voire 250 mm.s⁻¹ chez des jeunes plants de blé (Passioura, 1972).

Les flux phloémiens et xylémiens ne semblent pas pouvoir expliquer une signalisation longue distance à eux seuls et suggèrent la présence d'autres types de signaux tels que les potentiels électriques (potentiel d'action et onde lente) et les ondes hydrauliques. Julien (1993) émet l'hypothèse qu'une onde de pression hydraulique serait générée à la suite d'une stimulation

lésante et qu'elle pourrait propager le signal électrique à distance même au travers des tissus morts. Cette onde, liée à des modifications de pression, se propage le long du continuum hydraulique de la plante (Malone 1993) et peut ainsi être une source d'information rapide sur de longues distances. Il existe de nombreuses connexions hydrauliques entre le xylème et les différents tissus de la plante qui permettent de réapprovisionner les feuilles en eau, laquelle sort alors du système lors de l'incorporation du CO₂ essentiel à la photosynthèse (Cowan, 1977). Ce réseau hydraulique pourrait ainsi être à la base de la signalisation longue distance via la propagation d'une onde de pression au sein de la plante qui entraînerait des modifications de pression de turgescence dans les cellules environnantes, facteur de sensibilité pour les cellules végétales (Staves *et al.*, 1992). Raschke (1970) montre qu'une modification de la pression du xylème a un effet rapide sur l'ouverture des stomates. En effet, une légère surpression dans le xylème des feuilles de maïs, entraîne la fermeture des stomates et *vice versa*.

A l'heure actuelle, on ne connaît pas la (les) variable(s) responsable(s) de la signalisation longue distance. L'arrêt de croissance longitudinale intervient rapidement après une sollicitation mécanique et met donc forcément en jeu une signalisation longue distance très rapide dont le vecteur est inconnu à ce jour. Aux vues des caractéristiques de circulation des sèves xylémienne (variable au cours de la journée) et phloémienne (lente), il semblerait qu'il existe une autre manière de diffuser un signal rapidement. L'un des candidats pour ce rôle est l'onde hydraulique, si tant est qu'elle soit effectivement générée lors d'une flexion.

1.5. Objectifs de l'étude

Cette étude porte sur la caractérisation des phénomènes physiques et moléculaires générés par la flexion d'une tige de peuplier. Nous tenterons de répondre à trois questions principales :

- La flexion d'une tige génère-t-elle une onde hydraulique et, dans l'affirmative, quelles en sont les propriétés et les paramètres du stimulus qui les contrôlent ?
- Une surpression de la sève, sans déformation macroscopique de la tige, induit-elle une réponse moléculaire dans la zone d'élongation des cellules ?
- La flexion d'une tige génère-t-elle une réponse moléculaire dans la zone d'élongation des cellules. Quels en sont les acteurs et les similarités avec les réponses locales ?

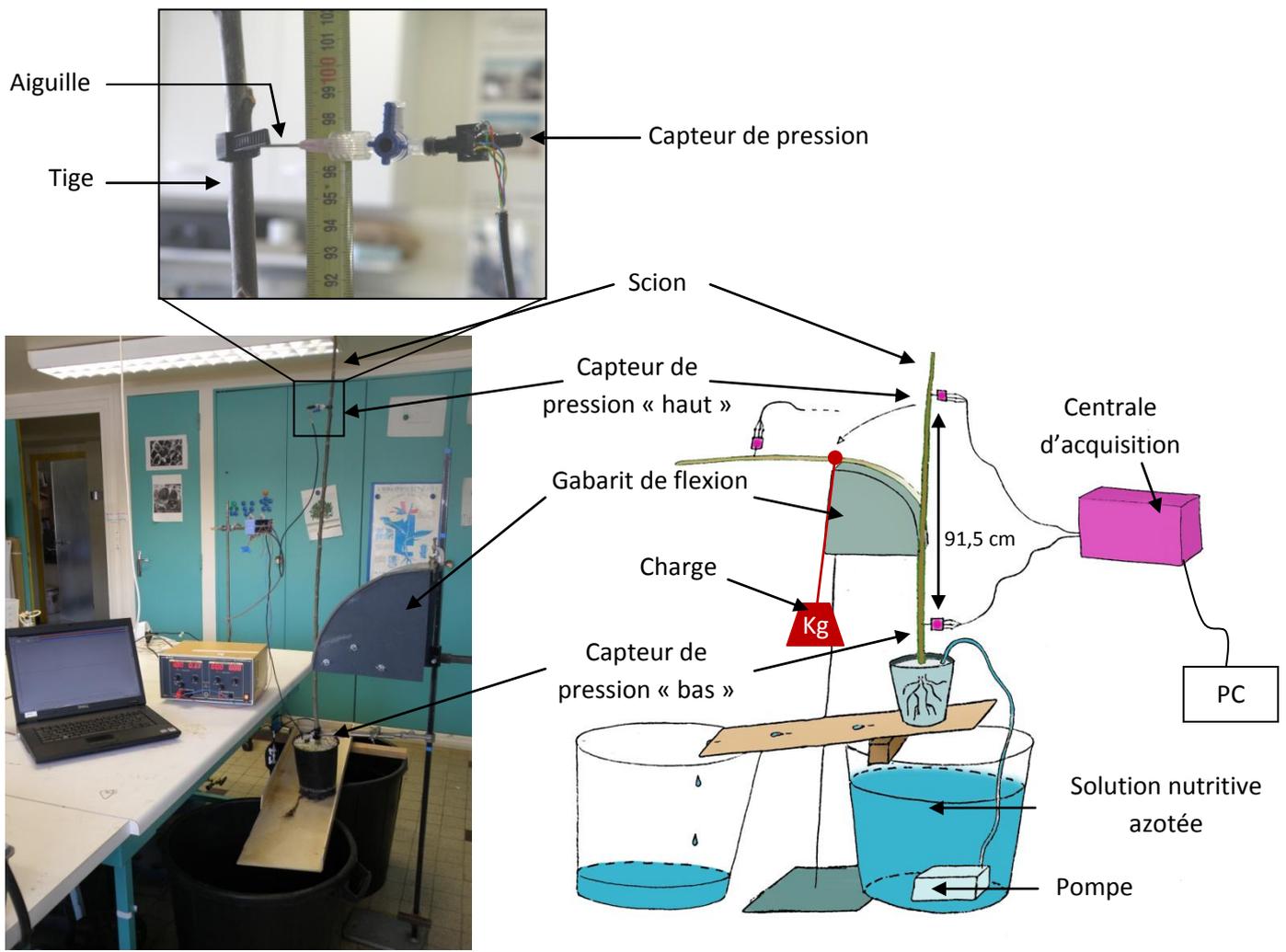


Figure 7 : Photographie (à gauche) et schéma (à droite) du dispositif utilisé pour réaliser les flexions du scion. Les gabarits de flexion sont positionnés de telle sorte que le centre de la zone fléchie soit à égale distance des deux capteurs de pression. Le lâché d'une charge permet d'imposer une vitesse de flexion reproductible. Une solution nutritive, apportée au goutte à goutte pendant 24 h, permet de générer une pression racinaire et d'obtenir une pression de sève positive dans la tige. Le capteur du haut est positionné à 91,5 cm de celui du bas.

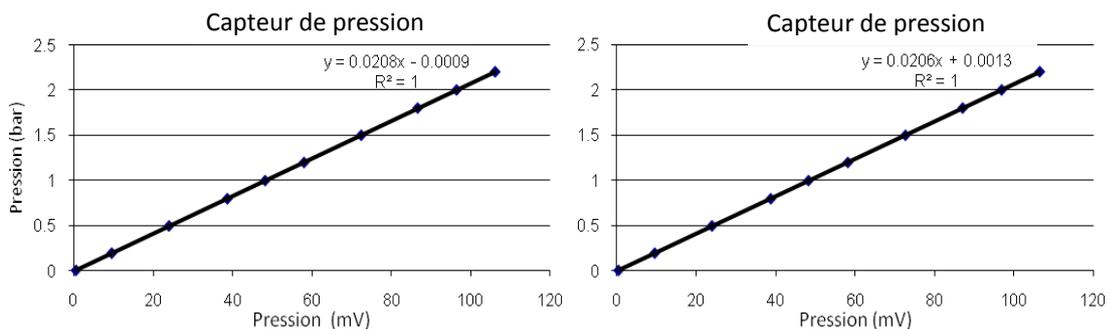


Figure 8 : Droites d'étalonnage des capteurs bas (gauche) et haut (droite).

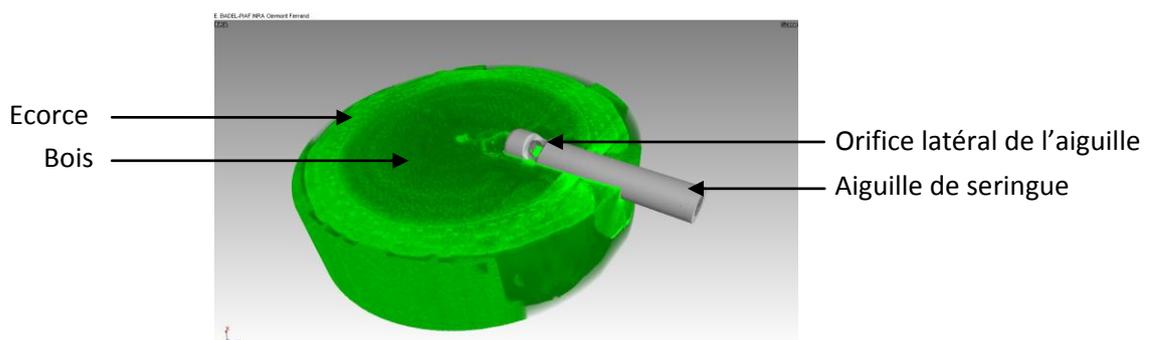


Figure 9 : Positionnement de l'aiguille reliant la colonne hydrique de la tige au capteur de pression (Observation réalisée par microtomographie à rayon X).

2. Matériels et Méthodes

2.1. Mise en évidence d'une propagation d'onde hydraulique dans le système vasculaire xylémien lors d'une flexion de tige

2.1.1. *Matériel végétal*

Afin de mettre en évidence la génération d'une onde hydraulique au sein de la plante, lors d'une flexion, nous avons utilisé trois lots de peupliers hybrides (*Populus tremula x alba*, clone 717-14B) :

- Des plants feuillés, d'environ 50 cm de haut, issus de culture *in vitro* puis cultivés en hydroponie dans une chambre de culture, puis en pot en serre. Pour une meilleure accessibilité de la tige et une manipulation plus aisée, les feuilles basales ont été supprimées à l'aide d'une lame de rasoir.
- Un scion de 2 ans, non débourré, d'environ 2 m de haut et 13 mm de diamètre à la base, cultivé dans un substrat de perlite. Il a été cultivé avec une solution nutritive sous dosée en azote, durant 24h, après lesquels la pression de la tige est devenue positive (Figure 7, Delaire, 2005 ; communication personnelle Beaujard F.). Pour la dernière flexion, le scion a été écorcé.
- Des segments de tiges de 25 cm de long, d'environ 7 mm de diamètre, sans feuille, issues de plantes de culture *in vitro* mises en pot.

2.1.2. *Mesures de pression*

La mesure de pression au sein de la tige a été réalisée à l'aide de capteurs de pression Omega (2 bars en pleine échelle) associés à deux OMEGABUS de la même marque et pilotés par un programme informatique que nous avons développé spécialement pour cette expérimentation. Ce dispositif a permis d'obtenir une acquisition automatique des pressions dans la tige à une fréquence rapide de 13 Hz. La qualité de l'étalonnage des capteurs présentée en figure 8, assurent la fiabilité des mesures présentées dans cette étude.

Les capteurs sont connectés au xylème (Figure 9) via une aiguille percée de 2 trous latéraux à son extrémité. Après avoir percé la tige, l'aiguille est connectée au capteur de pression, l'ensemble est rempli d'eau et étanchéifié par du parafilm®.

Concernant les plantes feuillées, un seul capteur de pression est positionné à 20 cm du collet tandis que pour le scion, deux capteurs ont été utilisés. Le premier « capteur bas » est

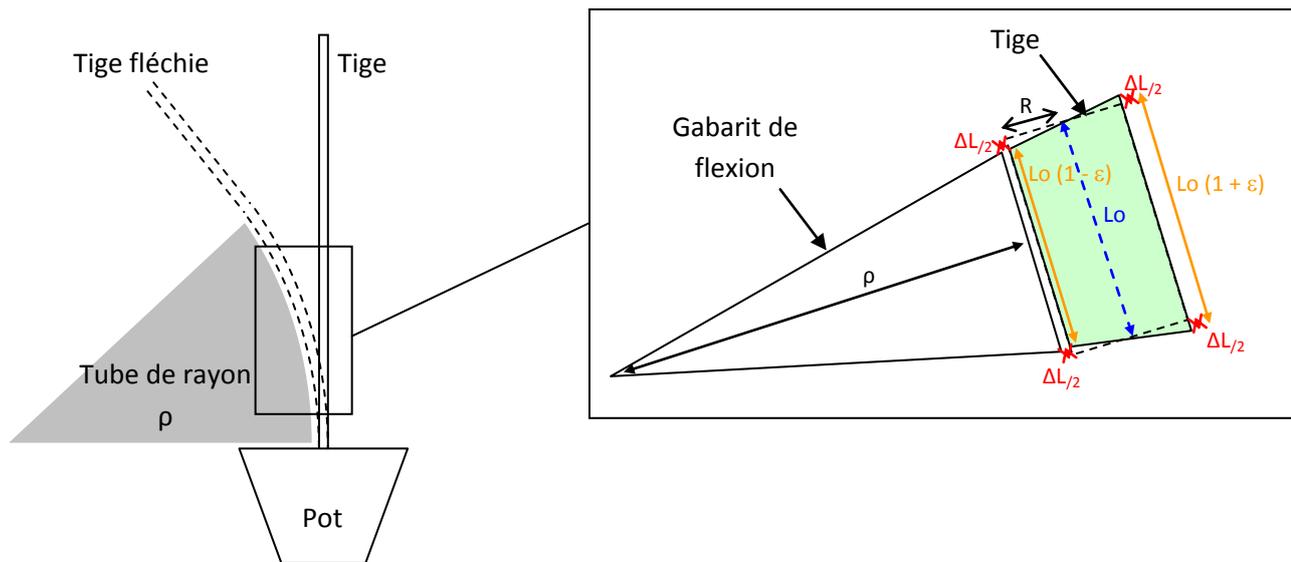


Figure 10 : Principe de flexion contrôlée d'une tige. La flexion génère une rotation des sections droites. Cela se traduit par un allongement des fibres dans la partie extérieure (fibres en tension longitudinale) et un raccourcissement des fibres dans la moitié de la section à l'intérieur de la courbure (fibre en compression longitudinale). La déformation est maximum à ces périphéries et est directement liée au rayon de courbure imposé. ρ = rayon du tube ; R = rayon de la tige ; L_0 = longueur de l'élément de tige considéré ; ε = déformation.

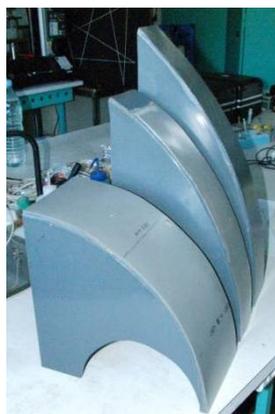


Figure 11 : Gabarits de flexion de 30, 50 et 70 cm de rayon, utilisés pour réaliser des flexions de tige à rayon de courbure constant.

positionné à 5,5 cm du collet tandis que le deuxième « capteur haut » est installé à 97 cm du collet, soit à 91,5 cm du capteur bas (Figure 7).

2.1.3. Flexion contrôlée

Les flexions sont réalisées sur des gabarits positionnés de telles sortes que les capteurs de pression soient à équidistance de la zone fléchie (Figure 7). Ces gabarits de rayon de courbure constant permettent de contrôler le niveau de déformation appliqué à la tige. La flexion d'une tige induit des déformations maximums (ϵ_{\max}) quantifiables, telle que :

$$\epsilon_{\max} = R / (\rho + R) \quad \text{où } R = \text{rayon de la tige et } \rho = \text{rayon du gabarit utilisé (Figure 10).}$$

Lors de ces expériences deux paramètres ont été contrôlés, d'une part le niveau de déformation subi par la plante et d'autre part la vitesse de flexion.

2.1.3.1. Influence du niveau de déformation imposé

Pour étudier l'impact du niveau de déformation des tiges à vitesse constante, les flexions ont été réalisées par l'intermédiaire d'une charge de 1,5 kg attachée à la partie supérieure de la portion de tige fléchie (Figure 7). Le lâché de la charge permet d'effectuer des flexions de tige rapides et reproductibles. Les niveaux de déformation maximum (ϵ_{\max}) appliqués à la tige ont varié de 0,85% à 1,80% selon le rayon de courbure du gabarit utilisé (30 cm à 70 cm) (Figure 11). Contrairement aux expérimentations sur la vitesse de flexion, la longueur de tige fléchie n'est pas nécessairement de 48 cm. Pour rendre les résultats comparables, nous avons normalisé l'amplitude du signal hydraulique par le volume de tige fléchie.

2.1.3.2. Influence de la vitesse de flexion

Dans cette expérimentation, le niveau de déformation a été fixé, d'une part le rayon de courbure du gabarit de flexion, 30 cm, qui correspond à une déformation maximum de 1,80 % pour le diamètre de tige considéré. D'autre part la portion de tige fléchie a été fixée à 48 cm de long. Les flexions ont ensuite été réalisées manuellement et qualifiées de « lente », « moyenne » et « rapide » lorsque la durée de flexion était respectivement d'environ 10 secondes, environ 1 seconde et inférieure à 1 seconde.

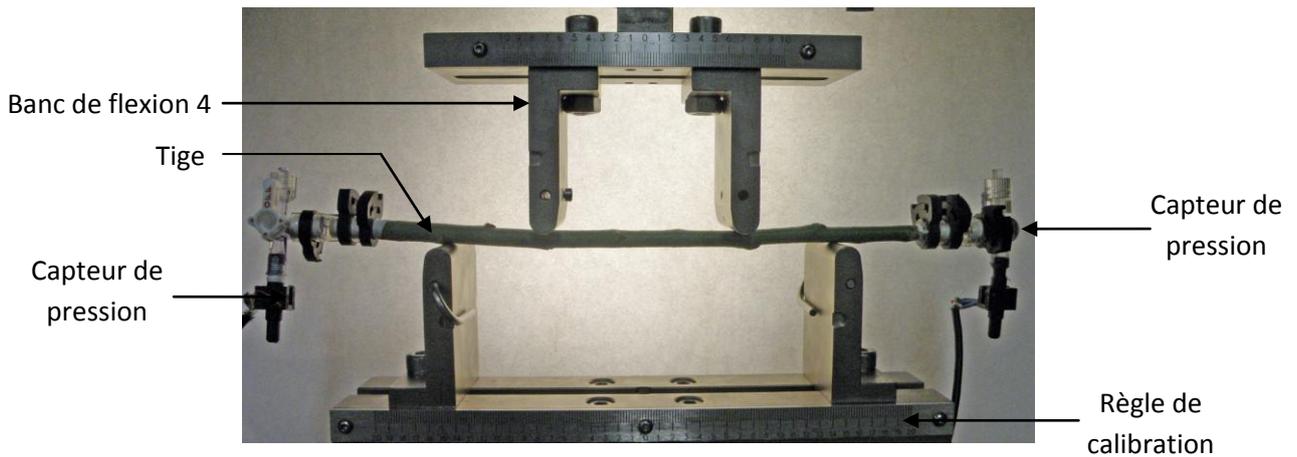


Figure 12 : Flexion 4 points réalisée sur une machine d'essais mécaniques (INSTRON 5565®). La flexion a été effectuée sur une portion de tige de 25 cm de long et de 7 mm de diamètre. A chaque extrémité, un capteur de pression est positionné.

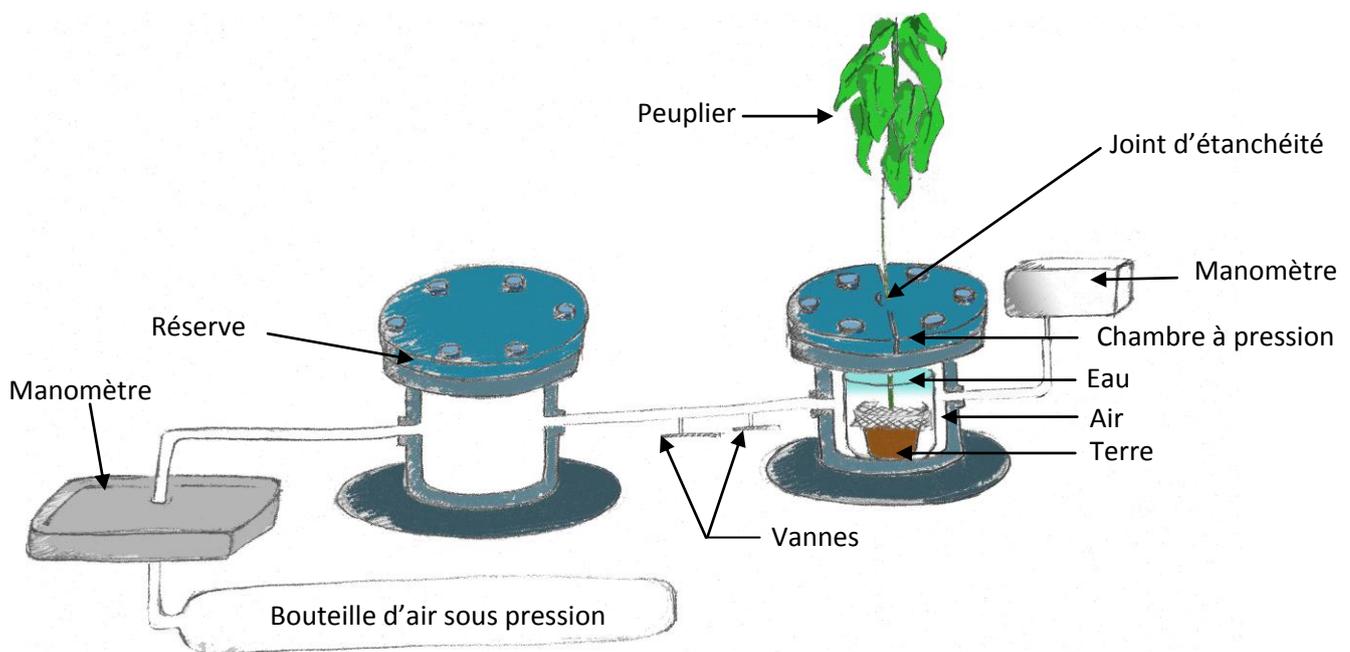


Figure 13 : Schéma du dispositif de mise sous pression des plants. Les peupliers sont positionnés, avec leur substrat, dans une chambre à pression équipée d'un manomètre. Le substrat est inondé d'eau puis la chambre est fermée hermétiquement. Cette dernière est connectée à un réservoir, positionné en amont du circuit, dont la pression est préalablement amenée à 3,2 bars. Une vanne permet d'ouvrir le circuit et de connecter les 2 chambres instantanément, amenant ainsi la pression de la chambre à 2 bars.

2.1.3.3. Flexion des segments de tige

Les flexions ont été réalisées à l'aide d'une machine d'essais mécaniques (INSTRON 5565), équipée d'un banc de flexion 4 points, qui permet de contrôler précisément le rayon de courbure et la vitesse de flexion. Les capteurs de pression sont positionnés à chaque extrémité du segment de tige (Figure 12). Les niveaux de déformations appliqués sont définis tels qu'ils soient représentatifs des sollicitations précédemment réalisées *in planta*.

2.2. Réponses moléculaires dans la zone en croissance de tiges de peuplier après mise sous pression des plants ou suite à une flexion

Pour cette expérimentation, 13 peupliers hybrides (*Populus tremula x alba*, clone 717-14B) issus de micro-bouturage, d'environ 50 cm de hauteur, ont été utilisés. Ces peupliers ont été cultivés dans des chambres climatiques à 20°C, sous une photopériode de 16 heures de jour pour 8 heures de nuit. Une solution nutritive de type 20-20-20 (N-P-K) a été apportée à une concentration de 0,5 g.L⁻¹. Un mois avant les expérimentations, les plants ont été transférés dans une serre non chauffée et à photopériode naturelle. Un lot de 7 plants a été utilisé pour les expérimentations de mise sous pression et un lot de 6 plants pour celles dites de flexion.

2.2.1. *Mise sous pression in planta*

Les sept plants de peuplier utilisés pour cette expérimentation (3 témoins et 4 stressés) ont tous été placés dans un récipient rempli d'eau, avec leurs racines et la terre de leur pot. Ce récipient a ensuite été positionné dans une chambre à pression où l'ensemble du système racinaire est hermétiquement séparé de la partie aérienne via un joint d'étanchéité (Figure 13). La chambre à pression est connectée à une réserve positionnée en amont du circuit et préalablement amenée à une pression de 3,2 bars. Une vanne permet de mettre instantanément les deux chambres en relation et d'atteindre un équilibre à 2 bars. Une autre vanne permet d'ouvrir le circuit et de faire chuter la pression de la chambre à la pression atmosphérique.

Afin de s'affranchir du stress lié à la mise en place des plantes dans la chambre à pression, un délai de 3 heures, après l'installation, a été pris pour effectuer les expériences. Après 3 heures au repos, les plantes du lot « stressé » sont mises sous pression durant 10 secondes, les plantes du lot « témoin » sont installées durant le même laps de temps dans le dispositif mais sans être mises sous pression.

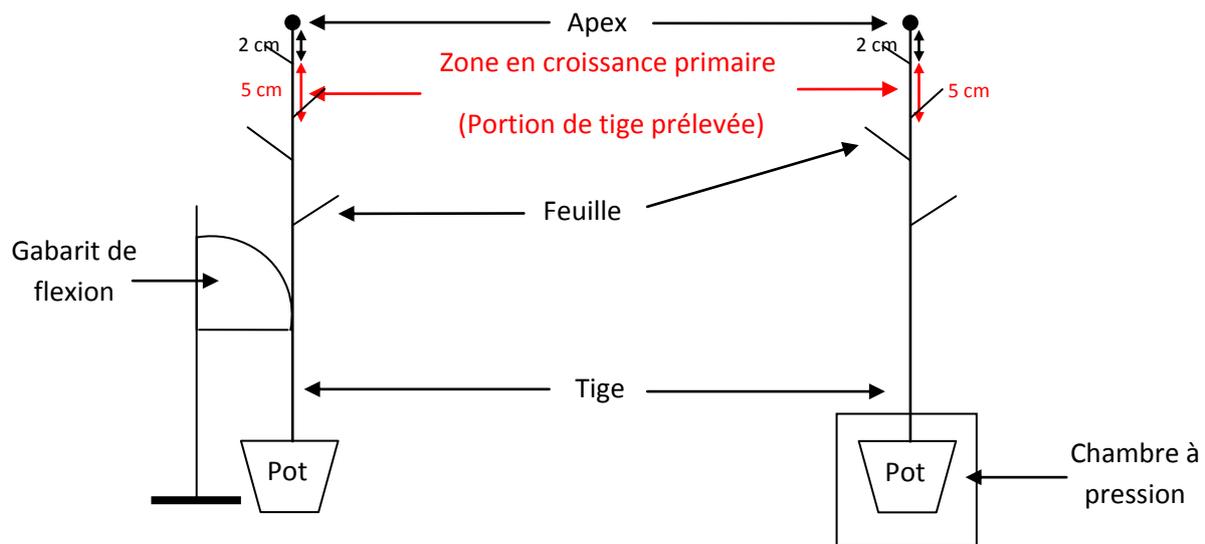


Figure 14 : Schéma des zones prélevées pour les analyses d'expressions moléculaires. Après flexion (ou mise sous pression), 5 cm de tige correspondant à la zone en croissance primaire (Gray-Mitsumune, 2004), ont été prélevés.

Tableau 1 : Identification des plants utilisés pour les analyses biomoléculaires au niveau local. Sur ce tableau sont représentés les tissus prélevés pour chaque plant (E = Ecorce, B = Bois, C = Compression et T = Tension), les sollicitations mécaniques infligées aux plants en cours d'expérimentation et le jour du prélèvement destiné à la biologie moléculaire.

N° Plante	Prélèvements				Traitements en cours d'expérimentation	Traitements le jour du prélèvement	
	EC	ET	BC	BT			
0	EC	ET	BC	BT	Pas de flexion	Flexion le jour du prélèvement	
1	EC	ET	BC	BT	Flexion tous les 3 jours	Flexion le jour du prélèvement	
3	EC	ET	BC	BT	Flexion tous les 3 jours	Flexion le jour du prélèvement	
7	EC	ET	BC	BT	Flexion tous les 3 jours	Flexion le jour du prélèvement	
9	E		B		Flexion tous les 3 jours	Pas de flexion	
10	E		B		Flexion tous les 3 jours	Pas de flexion	
Témoin	13	/	/	B	Pas de flexion	Pas de flexion	
Témoin	14	E		B	Pas de flexion	Pas de flexion	
	15	EC	ET	BC	BT	Pas de flexion	Flexion le jour du prélèvement
	16	EC	ET	BC	BT	Pas de flexion	Flexion le jour du prélèvement
Témoin	17	E		/	/	Pas de flexion	Pas de flexion

2.2.2. Flexion des tiges in planta

Parmi les 6 plantes utilisées pour cette expérimentation, 3 ont subi des niveaux de déformation maximum de l'ordre de 1% tandis que les 3 restantes ont servi de témoin. Chaque plante a été disposée de la même manière sur la table d'expérimentation. Les flexions ont été réalisées manuellement à l'aide d'un gabarit de 30 cm de rayon et maintenues durant 10 secondes afin de correspondre à la durée du signal hydraulique observée lors de la flexion du scion.

2.2.3. Prélèvements pour les analyses d'expression moléculaires

Afin d'étudier l'impact de ces traitements sur la régulation à distance de gènes dans des organes en croissances, une portion de tige d'environ 5 cm placée à 2 cm au dessous de l'apex a été prélevée 30 min après le traitement (mise sous pression ou flexion) (Figure 14), découpée et immédiatement plongée dans l'azote liquide.

2.3. Réponse moléculaire locale après flexion

Cette expérimentation a pour objectif d'observer les variations d'expressions géniques au niveau local afin de les comparer aux variations d'expressions observées à distance. Pour cela, 21 peupliers hybrides (*Populus tremula x alba*, clone 717-14B), de 180 cm de hauteur et 15 mm de diamètre, ont été produits par multiplication *in vitro* puis installés dans des pots de 4 litres en serre. Ils ont été cultivés sous arrosage automatique et nutrition minérale de type 15-5-15 (N-P-K). Parmi ces 21 plants, 11 ont fait l'objet d'une analyse biomoléculaire (Tableau 1). Durant 12 semaines (du 22/03/10 au 05/07/10), les plants ont été fléchis, ou non, 3 jours par semaine, toujours dans la même direction, sur 30 cm de tige. A la fin de l'expérimentation (le 06/07/10), certaines plantes témoins ont aussi été fléchies, 15 min avant le prélèvement. En d'autres termes, 4 lots de plantes ont été analysés (Tableau 1) : plantes fléchies tous les 3 jours ; plantes fléchies tous les 3 jours sauf celui du prélèvement ; plantes jamais fléchies (Témoin) ; plantes jamais fléchies sauf le jour du prélèvement.

2.3.1. Niveau de déformation

Le rayon de courbure utilisé, a été adapté de telle sorte que la déformation maximum (ϵ_{\max}) soit égale à 1%. Ainsi, le diamètre de la tige croissant au cours de l'expérimentation, le tube servant de support pour les flexions a été remplacé par un tube de rayon plus important.

2.3.2. *Prélèvement pour la biologie moléculaire*

Les prélèvements ont été réalisés 15 minutes après la flexion. Un centimètre de la portion de tige fléchie a été prélevé et séparé en 4 portions : écorce en tension (ET), écorce en compression (EC), bois en tension (BT) et bois en compression (BC). Après les prélèvements, les échantillons ont rapidement été plongés dans l'azote liquide.

2.4. Analyses d'expressions géniques

2.4.1. *Extraction d'ARNs*

Les analyses d'expressions géniques ont été effectuées à partir d'une extraction d'ARN selon la méthode CTAB utilisant le LiCl pour précipiter spécifiquement les ARNs. Ces derniers sont ensuite dosés au NanoDrop et dilués à une concentration finale de 0,5µg/µl. La qualité des ARNs a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, à raison de 1µg d'ARN par échantillon déposé.

2.4.2. *Synthèse d'ADNc*

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir du Kit Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen). 1 µg d'ARNs totaux sont incubés en présence d'oligodéoxythymines (50 µM) et de nucléotides (10 mM). Après dénaturation des ARNs pendant 5 min à 65 °C, la synthèse d'ADNc est réalisée en incubant les ARNs en présence de 200 U de reverse transcriptase pendant 1 h à 42°C. Les fragments d'ARNs totaux sont éliminés par l'ajout de 2 U de RNase incubée à 37 °C durant 20 min. La réaction est stoppée par une étape à 70 °C. La qualité des ADNc est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

2.4.3. *PCR semi quantitative en temps réel*

La technique de PCR semi quantitative en temps réel permet d'une part d'amplifier une séquence génique cible de manière exponentielle (comme une PCR classique) et d'autre part de connaître le niveau d'expression d'un gène donné par comparaison avec un gène référence.

Pour chaque gène étudié, 2 µL des ADNc dilués au 20^{ème} ont été ajoutés à un MasterMix 1X final (dNTPs et polymérase) et au couple d'amorce sens/antisens à 10 µM. Le volume final de la réaction est de 25 µL.

Tableau 2 : Liste des gènes d'intérêts étudiés, leurs fonctions et les amorces utilisées pour les amplifications d'ADNc. La température d'hybridation des amorces (Tm) et l'efficacité du couple d'amorce sont spécifiques à chaque couple d'amorce. S : sens ; AS : Anti-sens.

Gènes	Fonctions	Tm (°C)	Efficacité du couple d'amorce (%)	Séquences des amorces
<i>Pta-UBC</i>	Ubiquitine	61	88,7	S : GGG-TCC-AGC-TTC-TTG-CAG-TC AC : CCC-GGC-TCT-AAC-CAT-ATC-CA
<i>Pta-ZFP2</i>	Facteur de transcription induit lors d'une flexion	61	85,2	S : CGT-GCG-AGT-AAG-AAA-CC AS : CAC-AGA-ACT-CTC-TTG-CGT-CT
<i>Pta-ACS6</i>	Voie de biosynthèse de l'éthylène	61	100	S : ACT-ACA-GGA-AGA-TAT-TGA-ATG AS : TGG-CTT-CGA-GCA-ATG-AAA-AGA
<i>Pta-ACO1</i>	Voie de biosynthèse de l'éthylène	52,9	100	S : GAT-AAC-GAG-TGG-CCA-TCA-A AS : CCT-TCT-CCA-TCA-TTG-AAT-GCT-T
<i>Pta-TCH4</i>	Xyloglucan endotransglycosylase	61	86,7	S : GA-TGA-GAT-AGA-TTT-TGA-ATT-C AS : ATC-AGC-ATT-CCA-TAG-ACT-CGA
<i>Pta-TCH2</i>	Protéine fixant le Ca ²⁺	61	92,9	S : TGA-TCA-AGA-TGG-TGA-TGG-TAA-TG AS : CGC-AAA-AAC-ATC-AAT-GGA-AA
<i>Pta-JAZ5</i>	Protéine sensible aux jasmonates	58,4	90	S : TCT-TGC-TGC-AAC-CCT-TTC-TT AS : GGT-AAG-GCC-GAG-GAG-ATC-AT
<i>Pta-Expan1</i>	Relâche la tension pariétale	57	/	S : GGG-GTG-CTT-GGG-AAA-ATG-CT AS : CGC-CTC-AGC-CTC-AGT-CTC-CT
<i>Pta-IAA1</i>	Facteur de transcription induit par l'auxine	57	84,6	S : TAC-GCC-TAG-GGT-TAC-CTG-GA AS : GCG-AGG-AGC-AAC-AGT-TTT-CT
<i>Pta-ARR7</i>	Inductible par les cytokinines	52,9	100	S : ACC-AGA-TGT-TTG-GAG-GAG-GGA AS : TCT-TAC-TGG-CTT-CAA-GAA-AAA
<i>Pta-GA20 ox</i>	Voie de biosynthèse des gibbérellines	52,9	/	S : TTC-CAC-AAC-GAG-AGC-GGT-GTT-G AS : TTT-GAG-AGG-CAG-GGC-GGG-CGC-G
<i>Pta-Gid1</i>	Récepteur sensible aux gibbérellines	52,9	91,1	S : ACC-CAA-TGT-TTG-GTG-G AS : ATT-ACA-TGC-TGG-ATG-GTC-CCT

Pour chaque nouveau couple d'amorces utilisé, un gradient PCR a été effectué pour déterminer la température d'hybridation (T_m) des amorces. L'efficacité (E) de ces dernières a été calculée après avoir effectué une gamme de dilution des ADNc de 1/10 à 1/31250.

Le thermocycleur Biorad-iQ5, utilisé pour l'amplification, possède un dispositif capable de détecter les différents niveaux de fluorescence et ainsi détermine le Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycle à partir duquel la fluorescence mesurée sort du bruit de fond. La quantification relative (Q_r) de l'expression des gènes cibles est calculée selon la

$$Q_r = \frac{(1 + E)^{\Delta Ct \text{ gène cible}}}{(1 + E)^{\Delta Ct \text{ gène de référence}}}$$

formule :

Le tableau 2 présente les caractéristiques des amorces des gènes d'intérêts sélectionnés pour cette étude.

2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des Q_r ont été réalisées à l'aide du logiciel R après transformation logarithmique. Elle permet de réduire la variabilité amplifiée par la réaction PCR et par la méthode de calcul. Les hypothèses H_0 ont été rejetées pour un seuil de signification à 5%.

Pour les expérimentations au niveau local, le plan expérimental n'a pas permis d'utiliser une ANOVA pour l'ensemble du jeu de données. En effet, aucune distinction n'a été effectuée entre la portion de tige en compression ou en tension pour les plantes fléchies tous les 3 jours sauf le jour du prélèvement. De plus, la partielle redondance existante entre la variable traitement et la variable compression/tension complique l'analyse. De ce fait, 3 ANOVA ont été réalisées suite auxquelles le test post-hoc de Tukey a permis d'établir une hiérarchisation significative des différences observées.

Du fait du faible nombre de données, le test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon a été utilisé pour analyser les Q_r des expérimentations à distance.

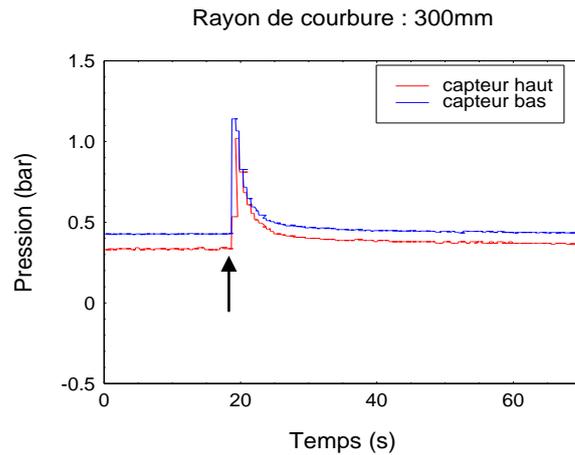


Figure 15 : Variations de pression au sein du xylème, en réponse à une flexion de tige. La flexion a été réalisée rapidement ($< 1\text{sec}$) sur un scion de 2 ans non débourré, à l'aide d'un gabarit de 30 cm de rayon ce qui correspond à une déformation maximale (ϵ_{max}) de 1,80 %. Les capteurs de pression sont installés à égale distance de part et d'autre de la zone fléchie. La courbe bleue correspond à la pression enregistrée par le capteur du bas positionné à 5 cm du collet. La courbe rouge correspond à la pression enregistrée par le capteur du haut positionné à 91,5 cm du capteur du bas, soit 97 cm du collet. La flèche noire indique le début de la flexion.

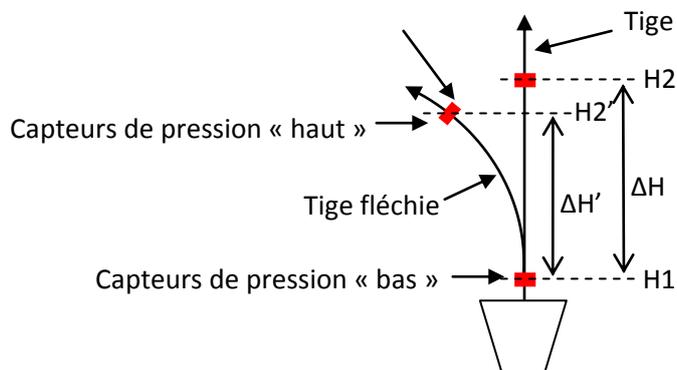


Figure 16 : Variation de la position du capteur du haut lors d'une flexion. Avant la flexion, le capteur du haut est positionné à une hauteur H2. Après flexion, le capteur de haut est positionné à une hauteur H2'.

3. Résultats

3.1. Mise en évidence de la propagation d'une onde hydraulique dans le système vasculaire xylémien lors d'une flexion de tige

3.1.1. *Caractérisation de l'onde hydraulique*

Afin de tester si une flexion de tige génère une onde hydraulique, des capteurs de pression ont été connectés au xylème de part et d'autre de la zone fléchie. Dans un premier temps, les expérimentations de flexion ont été réalisées sur des jeunes plantes feuillées. Au cours de ces essais préliminaires, aucune mesure de pression fiable n'a pu être effectuée à l'aide des capteurs. Plusieurs facteurs expliquent ces problèmes méthodologiques. D'une part, les diamètres des tiges étaient trop petits pour obtenir des connexions fiables entre la colonne d'eau de la tige et le capteur de pression. D'autre part, la présence de feuilles provoque la mise sous tension de la sève sous l'effet de l'évapotranspiration. Dans ce contexte, la mise en place du capteur de pression provoque une aspiration d'air créant l'embolie du système vasculaire. Pour contourner ces difficultés, nous avons travaillé sur un plant auquel nous avons physiologiquement augmenté la pression pour la rendre positive à l'aide d'une solution azotée (voir « 2.1.1. Matériel végétal »). Ce mode de culture génère une pression racinaire qui amène le système vasculaire en pression positive. La pression de sève a été mesurée à 0,47 bar pour le capteur du bas (P1) et 0,38 bar pour celui du haut (P2). La différence de pression observée entre les deux capteurs ($\Delta P = 0,09$ bar) s'explique par la différence d'altitude ($\Delta H = 91,5$ cm) séparant le capteur du haut (H2) de celui du bas (H1). Lorsqu'une flexion est appliquée à cette plante, une augmentation très rapide de la pression, suivie d'une période de relaxation, sont observées au niveau des deux capteurs (Figure 15). La pression mesurée en bas retrouve sa valeur initiale après quelques secondes, tandis que pour le capteur du haut, la pression se stabilise à une valeur supérieure à la valeur initiale. La variation de différence de pression avant et après flexion s'explique par la variation de différence d'altitude entre les capteurs. Avant comme après flexion, en régime stabilisé, on retrouve la relation $\Delta P = \rho g \Delta H$ avec $\Delta P = P2 - P1$ et $\Delta H = H2 - H1$ (Figure 16).

Afin de vérifier, que les variations de pression observées sont liées à un phénomène physique, un autre système de mesure a été utilisé. Des fragments de tiges ont été coupés sous l'eau pour éviter le phénomène d'embolie et les capteurs ont été fixés à chaque extrémité. Des flexions réalisées, à l'aide d'une machine d'essais mécaniques, sur ces segments de tige de

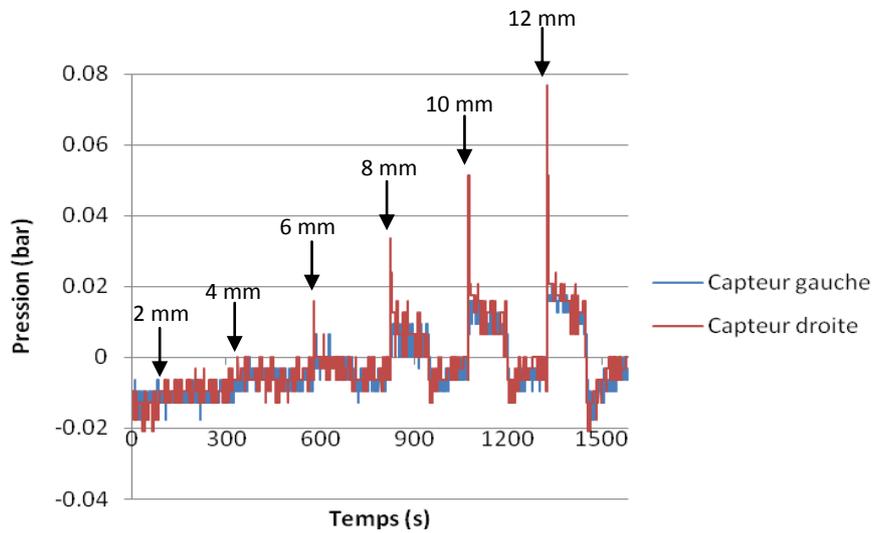


Figure 17 : Variations de pression au sein d'une portion de tige. Les flexions ont été réalisées à l'aide d'une machine d'essais mécaniques équipées d'un banc de flexion 4 points (INSTRON 5565), programmée pour réaliser des cycles de flexions d'amplitudes croissantes. Six flexions ont été imposées : 2, 4, 6, 8, 10 et 12 mm de déplacement avec retour à la position de repos entre chaque cycle.

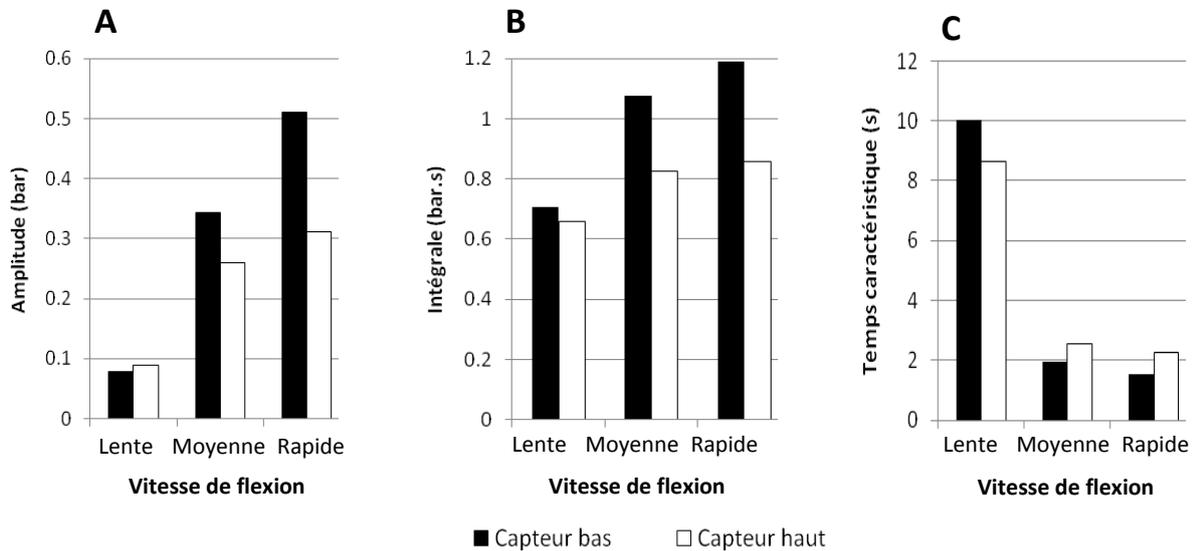


Figure 18 : Amplitude (A), intégrale (B) et temps caractéristique (C) du signal hydraulique après flexion d'un scion de 2 ans, non débourré, sur un gabarit de 30 cm positionné symétriquement par rapport aux deux capteurs (bas et haut). Les flexions ont été réalisées à trois vitesses différentes : lente (≈ 10 sec) ; moyenne (≈ 1 sec) et rapide (< 1 sec). Le capteur du haut est positionné à 91,5 cm du capteur bas. La vitesse d'acquisition des données est de 13 Hz.

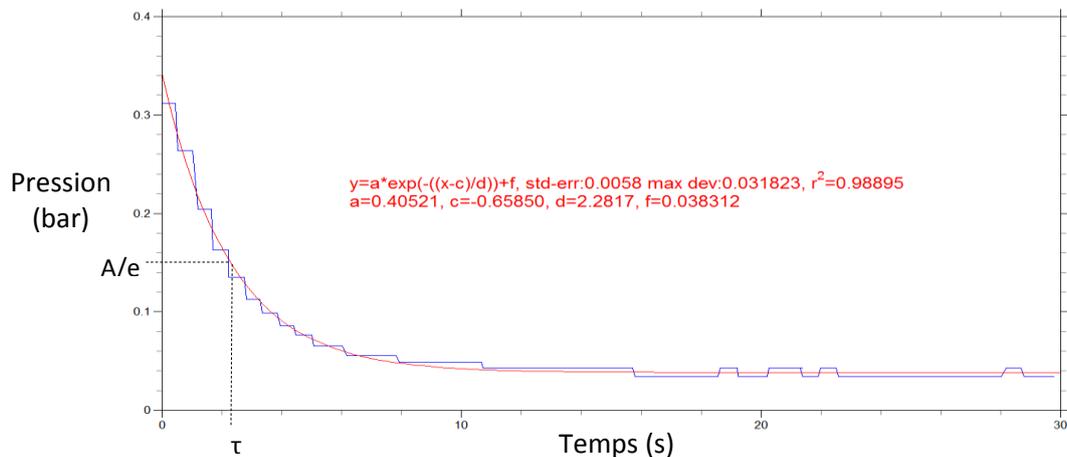


Figure 19 : Exemple de modélisation mathématique d'une série de donnée obtenue après flexion rapide d'un scion de 2 ans sur un gabarit de 30 cm de rayon. La courbe bleue représente le jeu de données expérimentales. La courbe rouge correspond à la modélisation par une exponentielle décroissante de type : $y = A * e^{-\frac{t-C}{\tau}} + F$ où A est l'amplitude du signal (bar), C l'origine de la courbe en x (t), τ le temps caractéristique de la relaxation (s) et F l'asymptote de la relaxation (bar).

petit diamètre (7 mm) induisent toujours le même type de réponses que celles observées chez le scion, à savoir une montée rapide de la pression puis une relaxation (Figure 17).

3.1.2. Influence de la vitesse de flexion

L'onde hydraulique générée lors d'une flexion a des caractéristiques différentes selon la vitesse à laquelle la flexion est réalisée. Ainsi, plus la flexion est réalisée rapidement, plus l'amplitude du signal est importante (Figure 18 A). Cette amplitude est déterminée par la différence entre les pressions initiale avant flexion et maximale pendant la flexion. Ainsi, l'amplitude mesurée par le capteur du bas, varie de 0,08 bar en flexion lente à 0,51 bar en flexion rapide. Les amplitudes des signaux mesurés par le capteur du haut répondent à la même règle, à savoir une corrélation positive entre la vitesse de flexion infligée à la plante et l'amplitude des variations de pression perçues (0,09 bar en flexion lente et 0,31 bar en flexion rapide).

A l'instar de l'amplitude des signaux enregistrée en dessous et au dessus de la zone fléchie, l'intégrale de ces mêmes signaux est corrélée, elle aussi, positivement à la vitesse de flexion infligée à la plante (Figure 18 B). Ainsi, lors d'une flexion lente, l'intégrale du signal est d'environ 0,7 bar.s tandis qu'elle est comprise entre 0,8 et 1,2 bars.s pour une flexion moyenne ou rapide.

A l'inverse des 2 paramètres présentés précédemment (amplitude et intégrale du signal), le temps caractéristique n'est pas corrélé positivement à la vitesse de flexion imposée (Figure 18 C). Le temps caractéristique est un paramètre permettant d'estimer la vitesse à laquelle la pression dans la tige revient à son niveau initial. Pour évaluer ce temps caractéristique, le jeu de données initial a été modélisé, via le logiciel Easyplot, par une exponentielle décroissante de type : $y = A * e^{-\frac{t-C}{\tau}} + F$ où A est l'amplitude du signal, C l'origine de la courbe en x (t), τ le temps caractéristique de la relaxation et F la valeur de pression après la relaxation (Figure 19). Ainsi, le temps caractéristique est relativement constant, environ 2 sec, pour les flexions à vitesse moyenne et rapide (Figure 18 C). Cependant, le temps caractéristique, lors d'une flexion lente, avoisine les 10 secondes.

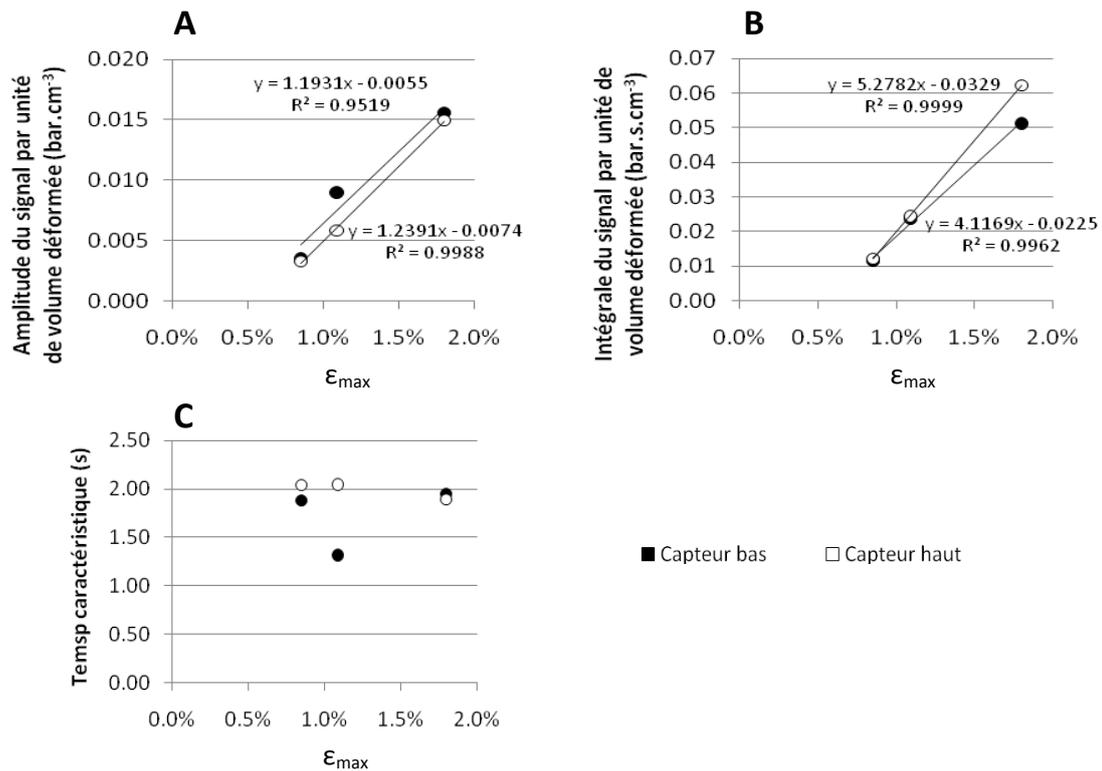


Figure 20 : Amplitude (A), intégrale (B) et temps caractéristique (C) du signal après flexion de tige en fonction de la déformation maximum (ϵ_{max}). Les flexions ont été réalisées sur un scion de 2 ans, non débouffré, avec des gabarits de 30 cm ($\epsilon = 1,80\%$), 50 cm ($\epsilon = 1,09\%$) et 70 cm ($\epsilon = 0,85\%$) positionnés symétriquement par rapport aux deux capteurs (bas et haut). Les flexions ont été réalisées à l'aide d'une charge de 1,5 kg afin de générer une vitesse de flexion reproductible. Le capteur du haut est placé à 91,5 cm de celui du bas.

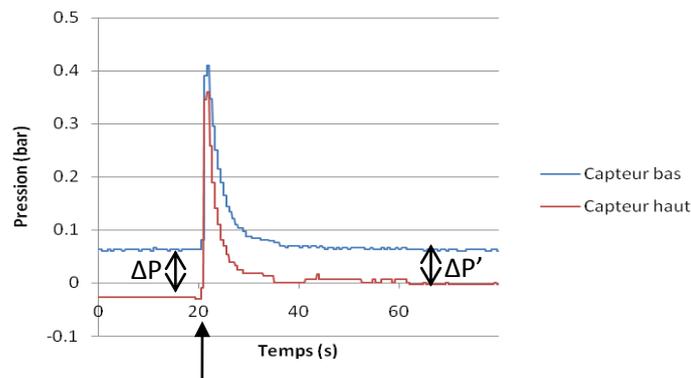


Figure 21 : Variations de pression au sein du xylème en réponse à une flexion de tige écorcée. La flexion a été réalisée rapidement ($< 1\text{sec}$) sur un scion de 2 ans non débouffré, auquel l'écorce a été ôtée au niveau de la portion de tige fléchée. La flexion a été réalisée à l'aide d'un gabarit de 30 cm de rayon. La courbe bleue correspond à la pression enregistrée par le capteur du bas, positionné à 5 cm du collet. La courbe rouge correspond à la pression enregistrée par le capteur du haut positionné à 91,5 cm du capteur du bas, soit 97 cm du collet. La flèche noire indique le début de la flexion. ΔP correspond à la différence de pression entre les deux capteurs avant la flexion et vaut $\rho g \Delta H$. $\Delta P'$ correspond à la différence de pression entre les deux capteurs après la flexion. $\Delta P' = \rho g \Delta H'$.

3.1.3. Influence du niveau de déformation

Pour étudier l'effet du niveau de déformation sur les propriétés du signal hydraulique, nous avons contrôlé la vitesse de flexion à l'aide d'une charge lâchée (voir « 2.1.3.1. Niveau de déformation »). Lors de ces expérimentations, la longueur de tige fléchie a varié selon le rayon de courbure du gabarit utilisé. C'est pourquoi, les résultats concernant l'amplitude des signaux et les valeurs d'intégrale ont été ramenées au volume de tige déformé (Figure 20). Ainsi, plus le niveau de déformation maximum imposé à la tige est élevé, plus l'amplitude des signaux est importante. Cette dernière est de l'ordre de $0,015 \text{ bar.cm}^{-3}$ lorsque la déformation maximum est de 1,80% alors qu'elle n'est que d'environ $0,003 \text{ bar.cm}^{-3}$ lorsque déformation maximum est égale à 0,85% (Figure 20 A).

De la même manière, l'intégrale du signal augmente lorsque le niveau de déformation maximum augmente (Figure 20 B). En effet, les valeurs d'intégrales des signaux perçus varient d'environ $0,012 \text{ bar.s.cm}^{-3}$ lorsque $\varepsilon_{\text{max}} = 0,85 \%$ à environ $0,055 \text{ bar.s.cm}^{-3}$ lorsque $\varepsilon = 1,80 \%$.

A contrario des 2 corrélations positives présentées précédemment, aucune corrélation n'est observée entre le temps caractéristique de relaxation du signal et le niveau de déformation maximum imposé à la tige (Figure 20 C). Dans la majorité des cas présentés ici, quelque soit le positionnement du capteur, le temps caractéristique est d'environ 2 secondes.

Après avoir montré l'influence de la vitesse de flexion sur les caractéristiques de l'onde hydraulique, ces résultats montrent que le niveau de déformation maximum subi par les tiges influence, lui aussi, les propriétés de l'onde hydraulique générée lors d'une flexion.

3.1.4. Voie de propagation de l'onde hydraulique

Après avoir étudié les propriétés physiques de l'onde hydraulique générée lors d'une flexion, nous avons testé si l'onde de pression circule au sein du xylème. Les flexions du scion préalablement écorcé déclenchent, de la même manière que précédemment, une augmentation rapide de la pression ainsi qu'une relaxation de quelques secondes (Figure 21).

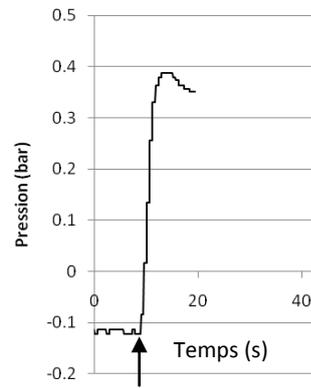


Figure 22 : Montée très rapide de la pression après mise sous pression du système racinaire dans la chambre à pression. La flèche représente le moment où la chambre à pression a été amenée à 2 bars. Les variations de pression ont été enregistrées à 97 cm du collet.

3.2. Mise en évidence d'une montée en pression de la colonne d'eau après mise sous pression du système racinaire

L'objectif de cette expérimentation est de valider la méthodologie consistant à mettre sous pression le système racinaire d'une plante pour faire varier la pression de la colonne d'eau.

Lorsque le système racinaire d'un scion de 2 ans, non débourré, est placé dans une chambre à pression et que l'on applique une pression de 2 bars au sein de cette chambre, une variation positive de la pression au sein du xylème est observée quasi instantanément (Figure 22). Cependant, l'amplitude de cette variation (0,5 bar), sur le capteur du haut, et la relaxation de pression que l'on observe par la suite sont difficilement analysables du fait de la présence de microfuites.

3.3. Réponses moléculaires, locale et à distance, suite à une flexion ou une mise sous pression des plantes

Les objectifs de cette expérimentation sont multiples. D'une part, ayant travaillé sur des plants de peuplier plus âgés et cultivés dans des conditions différentes de ceux utilisés habituellement pour les études d'expression de gènes au laboratoire, il s'agissait de vérifier, au niveau local, qu'une flexion de tige sur de telles plantes induisait les mêmes variations d'expression de *Pta-ZFP2* (gène marqueur de la mécanoperception) que celles connues à ce jour. D'autre part, toujours au niveau local, nous avons étudié plus finement la localisation de l'expression de ce gène marqueur suite à une flexion selon les tissus étudiés (écorce ou bois) et les contraintes subies par ces tissus (tension ou compression). Enfin, ayant montré qu'une flexion génère un onde hydraulique, le dernier objectif de cette expérimentation était d'étudier si, à distance (dans la zone en croissance), une mise sous pression de la tige mime les effets d'une flexion sur les variations de l'expression de certains gènes impliqués dans la mécanoperception et/ou dans la croissance primaire.

3.3.1. *Variation de l'expression locale du gène Pta-ZFP2 chez des peupliers cultivés en pot suite à une flexion*

Dans de jeunes plants de peuplier cultivés en hydroponie, l'expression du gène *Pta-ZFP2* est significativement plus forte 30 min après une flexion de tige (Martin *et al.*, 2009). Dans nos conditions, des variations significatives de l'expression du gène *Pta-ZFP2* sont observées

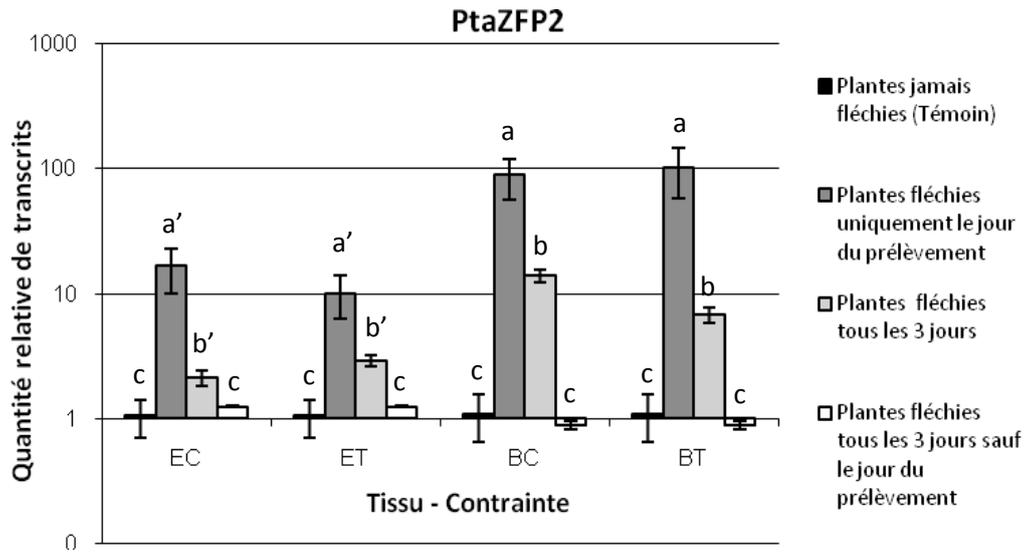


Figure 23 : Quantité relative de transcrit du gène *Pta-ZFP2* au niveau local après flexion. Localement, dans la zone en flexion, des portions de tige ont été prélevées, 15 min après flexion des plants. La quantité relative des transcrits a été calculée par rapport au gène de référence *Pta-UBC* par PCR semi quantitative en temps réel. Les résultats présentent les moyennes d'au minimum 3 répétitions techniques et 2 répétitions biologiques. Les logarithmes des quantités relatives de transcrits ont été analysés statistiquement via 3 ANOVA pour un seuil de signification de 5 %.

selon le type de traitement subi par la plante (Figure 23). Les plantes fléchies tous les 3 jours, sauf celui du prélèvement, ont un niveau d'expression similaire aux plantes témoins n'ayant jamais été fléchies, quelque soit les tissus et les types de déformations considérés. A contrario, les plantes fléchies uniquement le jour du prélèvement présentent une augmentation significative de la quantité relative de transcrits *Pta-ZFP2* par rapport aux témoins et à tous les autres traitements, pour chaque tissu et contrainte étudié ($P < 0,05$; Figure 23). De la même manière, mais dans une moindre mesure, l'expression de *Pta-ZFP2* est significativement plus élevée chez les plantes ayant subies des flexions tous les 3 jours, y compris le jour du prélèvement, par rapport aux témoins ($P < 0,05$; Figure 23).

De manière intéressante, au sein d'un même tissu (écorce ou bois), la flexion induit le même niveau d'expression de *Pta-ZFP2* que le tissu soit en compression ou en tension. Par contre, la quantité de transcrit de *Pta-ZFP2* dans le bois suite à une flexion est 10 fois plus importante que dans l'écorce ($P < 0,05$) (Figure 23).

3.3.2. *Variation de l'expression à distance de gènes mécanosensibles et/ou impliqués dans la croissance primaire suite à une flexion ou une mise sous pression*

3.3.2.1. Caractéristiques de la pression et de la flexion appliquées aux plantes

L'objectif de cette expérimentation est de comparer les variations d'expressions géniques dans la zone en croissance, suite à une flexion (déformation macroscopique des tissus) ou une mise sous pression de la sève (sans déformation macroscopique des tissus). Afin de mettre en évidence les effets propres à la propagation d'une onde de pression hydraulique, les peupliers ont été placés dans une chambre à pression permettant d'augmenter la pression interne de la tige. La fixation des capteurs créant des blessures sur les tiges, nous n'avons pas pu mesurer sur les plantes dédiées à la biologie moléculaire, la pression réelle induite par ces traitements. Concernant la mise sous pression, les mesures réalisées sur le scion (voir « 3.1. Mise en évidence de la propagation d'une onde hydraulique dans le système vasculaire xylémien lors d'une flexion de tige »), nous ont permis d'appréhender l'ordre de grandeur des valeurs de pression au sein du xylème que l'on pourrait retrouver *in planta* en milieu naturel, ainsi que la durée totale du signal hydraulique suite à une flexion. Ces mêmes paramètres ont donc été appliqués avec une mise sous pression imposée de 2 bars dans la chambre à pression durant 10 secondes. Dans ces conditions, une guttation a été observée au niveau des feuilles confirmant que la sève xylémienne était sous pression. Les flexions ont été, elles aussi, maintenues durant 10 secondes.

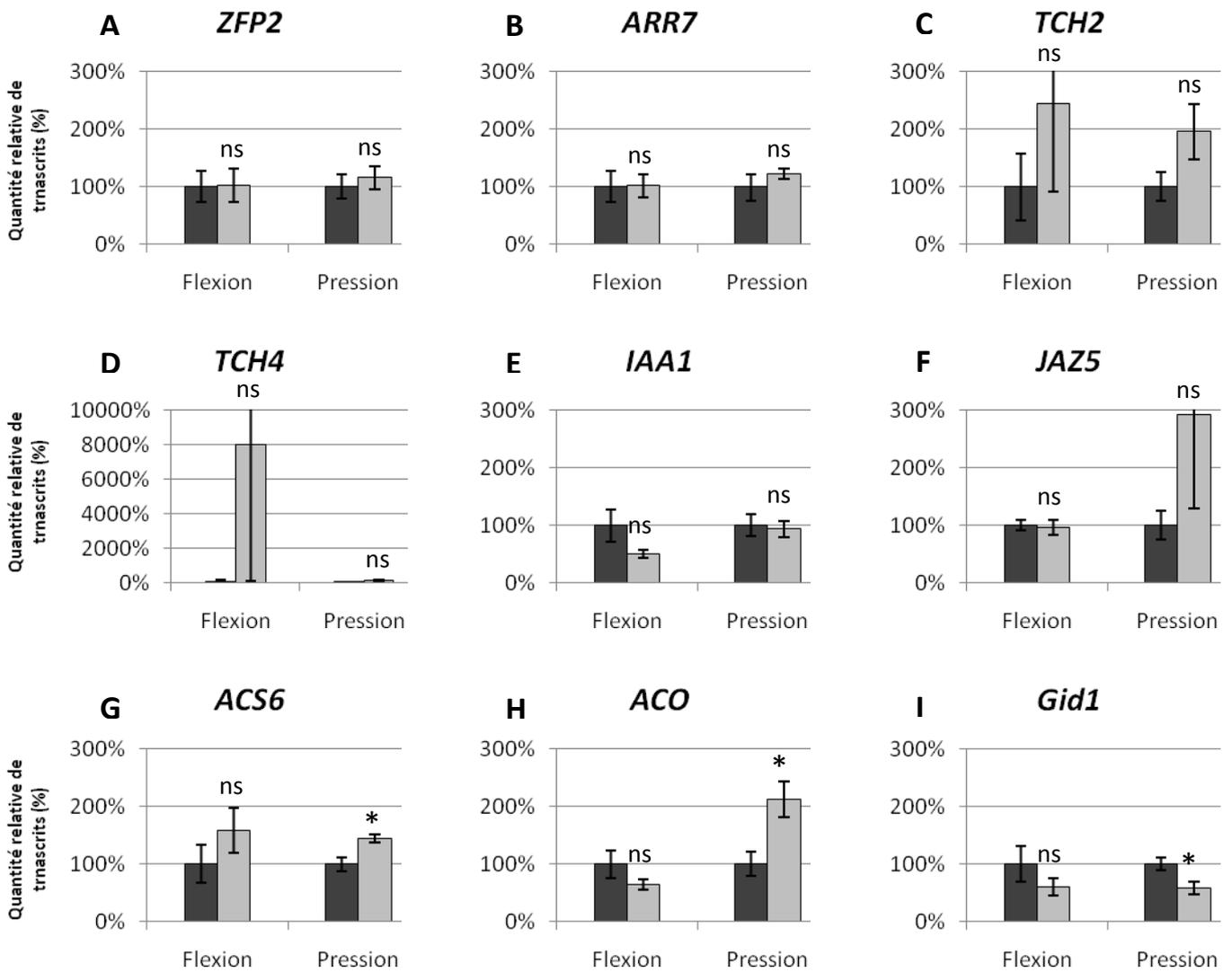


Figure 24 : Expressions relatives des gènes *ZFP2*, *ARR7*, *TCH2*, *TCH4*, *IAA1*, *JAZ5*, *ACS6*, *ACO1* et *Gid1* suite à une flexion ou une mise sous pression des plants. Des portions de tige de 5 cm, situées à 2 cm de l'apex, ont été prélevées 30 min après traitement. Pour chaque traitement, les témoins sont en gris foncé. La quantité relative des transcrits a été calculée par rapport au gène de référence *Pta-UBC* par PCR semi quantitative en temps réel. Les résultats présentent les moyennes d'au minimum 3 répétitions techniques et 2 répétitions biologiques. Les logarithmes des quantités relatives de transcrits ont été analysés statistiquement via le test de Mann-Whitney-Wilcoxon pour un seuil de signification de 5 % (*, $P < 0.05$; ns, non significatif).

3.3.2.2. Variation de l'expression des gènes étudiés

Comme évoqué dans la synthèse bibliographique, les acteurs moléculaires impliqués dans la réponse à distance, suite à une flexion, ne sont pas connus. Nous avons donc ciblés des gènes candidats connus comme étant impliqués (i) soit dans la croissance longitudinale (*Pta-IAA1*, *Pta-ARR7*, *Pta-Gid1*, *Pta-GA20ox*, *Pta-EXPI*), (ii) soit s'exprimant à distance suite à d'autres types de stress comme la brûlure (*Pta-ACS6*, *Pta-JAZ5*), (iii) soit connus comme étant régulés localement par une flexion (*Pta-ZFP2*, *Pta-TCH4*, *Pta-TCH2*, *Pta-ACS6*, *Pta-ACO1*, *Pta-JAZ5*).

L'expression des gènes *Pta-EXPI* et *Pta-GA20ox* n'a pu être analysée, les amorces choisies n'étant pas suffisamment spécifiques pour être utilisées en Q-PCR.

Comme le montre la figure 24, ni la flexion ni la mise sous pression n'ont induit de variations significatives de l'expression des gènes *Pta-ZFP2*, *Pta-ARR7*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH4*, *Pta-IAA1* et *Pta-JAZ5*. Concernant le gène *Pta-TCH2*, on observe une surexpression aussi bien à la suite d'une flexion qu'après une mise sous pression (Figure 24 C). Toutefois, la variabilité observée entre les échantillons ne permet pas de valider statistiquement cette tendance mais encourage à une étude plus poussée.

Concernant les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, *Pta-ACS6* et *Pta-ACO1*, une augmentation significative de la quantité de transcrits ($P < 0,05$) est observée dans les plantes ayant été mises sous pression (Figure 24 G et H). Bien que lors d'une flexion, des tendances soient similaires, notamment pour *Pta-ACS6*, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence.

Pour le gène *Pta-Gid1*, qui code pour un récepteur des gibbérellines, on constate au contraire une inhibition significative de la quantité de transcrit ($P < 0,05$) dans les plantes mises sous pression (Figure 24 I). Encore une fois, comme pour le gène *Pta-ACS6*, la flexion n'a pas fait varier de manière significative l'expression de ce gène, même si une tendance à l'inhibition semble pouvoir se dégager.

4. Discussion

L'objectif principal de ce travail était de mettre en évidence la génération et la propagation d'une onde hydraulique lors d'une flexion de tige, et d'essayer de découpler les réponses moléculaires à distance dues à la déformation mécanique de celles dues aux variations de pression induites par une flexion de tige.

4.1. Propagation d'une onde hydraulique suite à une flexion

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence, sur un scion non débourré, qu'une flexion de tige génère une onde de pression hydraulique capable de se propager le long de la tige sur de longue distance. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Malone (1996) qui a observé un gonflement des feuilles après blessure. L'onde hydraulique se propage quasi instantanément dans le xylème à la fois vers le sommet et la base de la plante. Nous avons montré qu'elle pouvait se propager au moins jusqu'à 50 cm mais, si l'on considère un arbre la propagation de cette onde pourrait certainement s'effectuer tout au long de la colonne d'eau jusqu'à la partie apicale ; sous réserve que l'élasticité des tissus conducteurs n'amortissent pas trop le signal. Les caractéristiques de l'onde de pression hydraulique sont fortement dépendantes de la vitesse de flexion et du niveau de déformation appliqué qui sont des paramètres dépendants, dans la nature, de l'origine du stimulus comme peut l'être par exemple le vent. Ainsi, plus la fréquence et la force du stimulus sont importantes, plus la vitesse de flexion et le niveau de déformation seront importants. De plus, nous avons montré que le temps caractéristique de relaxation de la pression semble fixe, environ 2 sec, quelque soit la vitesse de flexion et le niveau de déformation appliqué. Ainsi, une onde de pression de grande amplitude, générée par un vent fort, induit une quantité de signal hydraulique plus importante.

Il est à noter que l'application d'une flexion lente (≈ 10 s) induit un signal hydraulique différent de celui d'une flexion moyenne ou rapide. En effet, nous avons observé que l'onde de pression se propage très rapidement. Lors d'une flexion rapide, le signal hydraulique mesuré à distance par les capteurs de pression correspond à l'ensemble des déformations cumulées en une fraction de seconde, on parle d'une réponse de type impulsionnelle. A contrario, dans le cas d'une flexion lente, le signal hydraulique mesuré résulte de l'addition d'une multitude de petits signaux qui s'étalent dans le temps, on parle d'une réponse de type cumulée. Ainsi, les caractéristiques de l'onde de pression observée ne correspondent donc pas

tout à fait aux mêmes conditions si l'on est en présence d'une flexion rapide ou lente par rapport au temps caractéristique du signal de réponse.

Les niveaux de déformations maximum ($0,85 \% < \epsilon_{\max} < 1,80 \%$) et les vitesses de flexions ($\approx 1 \text{ s}$) appliqués à la tige dans cette étude, miment ce que l'on peut raisonnablement retrouver dans la nature. Du fait des problèmes méthodologiques rencontrés, nous avons travaillé avec un scion préalablement amené à une pression positive tandis que dans la nature, les colonnes d'eau des systèmes vasculaires des végétaux sont généralement sous tension. Bien qu'au niveau physique, rien n'indique que la propagation de l'onde puisse être différente si le niveau de pression initial était différent, nous ne pouvons pas affirmer que les résultats présentés ici, sur les caractéristiques de l'onde hydraulique générée par une flexion, soient totalement représentatifs de ce que l'on pourrait retrouver dans la nature où la pression dans la colonne d'eau est généralement négative. Toutefois, les mesures effectuées sur les portions de tiges, à pression nulle, les corroborent.

4.2. Variations d'expressions géniques

Nous avons utilisé des plants de peuplier de grande taille ce qui nous a permis de nous rapprocher des caractéristiques physiologiques d'un arbre adulte (présence de lignine) *in natura*. Ces arbres ont été cultivés dans des conditions différentes de celles qui avaient été testées auparavant au laboratoire. Nous avons montré, via l'utilisation d'un gène marqueur de la mécanoperception (*Pta-ZFP2*), une surexpression du gène *Pta-ZFP2*, au niveau local, suite à des flexions. Ces résultats sont en adéquation avec ceux présentés par Martin (2009) sur plants cultivés en hydroponie. De plus, à l'instar de Martin (2010), nous avons montré un phénomène d'accommodation des plantes de peupliers à la flexion. Ces résultats suggèrent que ces inductions ne sont pas dépendantes de la morphologie des plantes et que les variations d'expressions montrées par des études antérieures sont comparables aux variations présentées ici. Nous pouvons donc en déduire que les plantes de grandes tailles utilisées dans cette étude ne provoquent pas de biais pour l'interprétation des résultats de variations d'expressions.

A distance, dans la zone d'élongation des cellules, nous avons mis en évidence qu'une mise sous pression des plantes, sans déformation de la tige, induit la surexpression des deux enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'éthylène (*Pta-ACS6* et *Pta-ACO1*) et l'inhibition de l'expression du gène *Pta-Gidl* codant pour un récepteur des gibbérellines. L'éthylène est une hormone connue pour être impliquée dans de nombreux aspects du développement

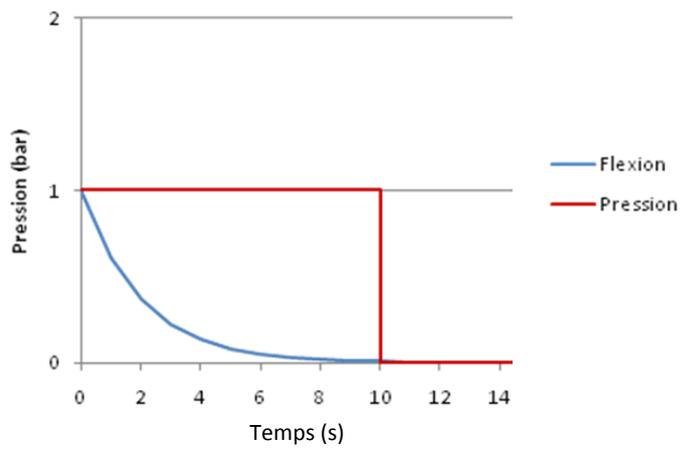


Figure 25 : Quantification des signaux hydrauliques perçus par la plante. La courbe rouge représente la quantité de signal généré par une mise sous pression de 10 secondes. La courbe bleue représente la quantité de signal généré par flexion de 10 secondes. Dans ce cas, lorsque les plantes sont mises sous pression durant 10 secondes, l'intégrale du signal vaut 10 bar.s. Lorsque les plantes sont fléchies et maintenues durant 10 secondes l'intégrale du signal vaut 1,98 bar.s.

végétal, notamment dans l'inhibition de l'allongement de tiges chez le peuplier. A l'inverse, les gibbérellines stimulent la croissance (Mauriat and Moritz, 2009). Les résultats obtenus convergent donc vers une inhibition de la croissance primaire comme il avait été préalablement observé lors d'une flexion de tige de tomate (Coutand *et al.*, 2000), de noyer (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008) ou de peuplier (Pruyn *et al.*, 2000).

Cependant, le niveau de surexpression du gène *Pta-ACS6* dans une portion de tige à distance, est relativement faible par rapport aux résultats de Martin (2010) qui avait observé une induction, d'un facteur 15, de l'expression de ce gène au niveau local. Comme Tixier (2010), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un effet de la flexion, à distance, sur l'expression des gènes étudiés même si certaines tendances, similaires aux résultats obtenus lors de la mise sous pression, notamment pour les gènes *Pta-ACS6* et *Pta-Gidl*, semblent se dessiner. Parmi les hypothèses pouvant expliquer ce résultat, on peut avancer que lors de la flexion, le signal hydraulique est nettement plus faible que celui que nous avons induit artificiellement par la chambre à pression. En effet, d'un point de vue quantitatif, les signaux hydrauliques générés, perçus par les plantes suite à une flexion sont différents de ceux générés lors d'une mise sous pression (Figure 25). Le cumul dans le temps de pression hydraulique générée lors d'une mise sous pression est environ 5 fois supérieur à celui généré lors d'une flexion. De plus, l'onde générée par la flexion peut, lors de sa propagation, être amortie par les tissus et les organes, notamment les feuilles qui servent alors de chambre d'expansion. Or, nous avons étudié un génotype à grandes feuilles qui peut amplifier cet effet d'amortissement. De plus, Pruyne (2000) a montré que les réponses de croissances primaires varient selon le génotype de peuplier considéré, il apparaîtrait donc pertinent d'étudier d'autres génotypes. Il est aussi possible que la partie apicale de la plante soit moins sensible aux sollicitations mécaniques du simple fait qu'elle soit l'organe le plus exposé aux épisodes venteux. En effet, comme on a pu le mesurer, les tissus ont une capacité de désensibilisation aux flexions répétées. Enfin, à l'heure actuelle, on ne connaît pas la cinétique d'expression à distance des gènes étudiés dans cette étude et on peut se demander s'ils sont de bons gènes candidats. En effet, malgré leurs rôles et la localisation de leurs expressions on ne peut pas être certains d'avoir ciblé les bons gènes. Fort de cette expérience, il serait donc pertinent, lors de prochaines expérimentations, d'aborder le problème par une approche plus globale de telle que l'utilisation de puce à ADN.

5. Conclusion et perspectives

Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence la génération et la propagation d'une onde hydraulique à la suite d'une flexion de tige de peuplier. Les propriétés de cette onde sont fortement dépendantes des caractéristiques du stimulus appliqué et notamment de la vitesse et de l'amplitude de la sollicitation qui peut faire varier l'amplitude du signal hydraulique. A l'échelle moléculaire, des résultats encourageants ont été présentés dans cette étude, particulièrement ceux concernant la surexpression des gènes *Pta-ACS6* et *Pta-ACO1* et l'inhibition du gène *Pta-Gid1* qui coïncident avec la diminution de la croissance primaire observée chez la tomate (Coutand *et al.*, 2000), chez le noyer (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008) ou encore chez le peuplier (Pruyn *al.*, 2000). Cependant, aucune preuve formelle ne permet à ce jour d'affirmer que l'onde hydraulique est le vecteur longue distance en réponse à une stimulation mécanique.

De véritables questions méthodologiques se posent à la suite de ces expérimentations, notamment sur les mesures de pression. En effet, à l'heure actuelle, celles-ci nécessitent de planter une aiguille dans la tige. Or, plusieurs études ont montré qu'une blessure peut induire des réponses moléculaires du même type que la flexion. Il n'était donc pas envisageable de mesurer la pression sur les plants destinés aux analyses d'expression moléculaires. Afin de palier à ce problème, il faudrait envisager des méthodes de mesures de pression non invasives et donc indirectes. Pour ce faire, une méthode, consistant à observer les variations de diamètre de la tige lors du passage d'une onde de pression par une technique sans contact, semble envisageable.

Enfin, se pose la question du choix de l'hybride de peuplier qui peut, à la suite d'une flexion, ne pas répondre en termes de croissance primaire (Pruyn, 2000). Il paraît pertinent dans le cadre d'une poursuite de ces investigations de tester les réponses de différents clones.

Références bibliographiques

- Baluska, F. and A. Hlavacka 2005. Plant formins come of age: something special about cross-walls. *New Phytologist*. 168:499-503.
- Baluska, F., J. Samaj, P. Wojtaszek, D. Volkmann and D. Menzel 2003. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiology*. 133:482-491.
- Baydoun, E.A.H. and S.C. Fry 1985. The Immobility of Pectic Substances in Injured Tomato Leaves and Its Bearing on the Identity of the Wound Hormone. *Planta*. 165:269-276.
- Boyer, N., M.O. Desbiez, M. Hofinger and T. Gaspar 1983. Effect of Lithium on Thigmomorphogenesis in *Bryonia-Dioica* Ethylene Production and Sensitivity. *Plant Physiology*. 72:522-525.
- Braam, J. and R.W. Davis 1990. Rain-Induced, Wind-Induced, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin-Related Genes in *Arabidopsis*. *Cell*. 60:357-364.
- Coutand, C. 2010. Mechanosensing and thigmomorphogenesis, a physiological and biomechanical point of view. *Plant Science*. 179:168-182.
- Coutand, C. and B. Moulia 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany*. 51:1825-1842.
- Coutand, C., L. Martin, N. Leblanc-Fournier, M. Decourteix, J.L. Julien and B. Moulia 2009. Strain Mechanosensing Quantitatively Controls Diameter Growth and PtaZFP2 Gene Expression in Poplar. *Plant Physiology*. 151:223-232.
- Coutand, C., M. Chevolut, A. Lacoïnte, N. Rowe and I. Scotti 2010. Mechanosensing of stem bending and its interspecific variability in five neotropical rainforest species. *Annals of Botany*. 105:341-347.
- Cowan, I.R. 1977. Stomatal behaviour and environment. *Advances in Botanical Research*. 4:117-228.
- Crouzet, J. 2002. Caractérisations physiologique et moléculaire de l'effet d'une sollicitation mécanique chez le noyer (*Juglans regia*). DEA.

Darwin, C. and F. Darwin 1881. The power of movement in plants.

Delaire M. 2005. Variations de la capacité d'absorption minérale par les racines du jeune *Acer pseudoplatanus*, L. (Acérécées) consécutives à l'histoire nutritionnelle récente et ancienne de la plante. Application à la culture hors sol des végétaux ligneux. Thèse, Sciences Agronomique. Université d'Angers. p 161.

Farmer, E.E. and C.A. Ryan 1990. Interplant Communication - Airborne Methyl Jasmonate Induces Synthesis of Proteinase-Inhibitors in Plant-Leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87:7713-7716.

Gartner, B.L. 1994. Root biomechanics and whole-plant allocation patterns. Responses of tomato plants to stem flexure. Journal of Experimental Botany. 45:1647-1654.

Gray-Mitsumune, M., E.J. Mellerowicz, H. Abe, J. Schrader, A. Winzell, F. Sterky, K. Blomqvist, S. McQueen-Mason, T.T. Teeri and B. Sundberg 2004. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup a of the alpha-expansin gene family (1[w]). Plant Physiology. 135:1552-1564.

Jacobs, M.R. 1954. The effect of wind sway on the form and development of *Pinus radiata* D. Don. Australian Journal of Botany:35-51.

Jaffe, M.J. 1973. Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. Planta. 114:143-157.

Jaffe, M.J. 1976. Thigmomorphogenesis. Electrical resistance and mechanical correlates of the early events of growth retardation due to mechanical stimulation in beans. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 78:24-32.

Jaffe, M.J., A.C. Leopold and R.C. Staples 2002. Thigmo responses in plants and fungi. American Journal of Botany. 89:375-382.

Jaffe, MJ and F.W. Telewski 1984. Thigmomorphogenesis : callose and ethylene in hardening of mechanically stressed plants. In B.N. Timmermann, C. Steeling, and F.A. Loewus [eds], Phytochemical adaptation to stress. 79-95. Plenum, New York, USA.

Julien, J.L. 1993. Caractérisation électrophysiologique de l'onde de dépolarisation déclenchée par un traumatisme chez *Bidens pilosa* L. Thèse, Physiologie Végétale. Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand). p 132.

- Kern, K.A., F.W. Ewers, F.W. Telewski and L. Koehler 2005. Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology*. 25:1243-1251.
- Lakhal, W. 2010. Caractérisation moléculaire de la cinétique d'acclimatation des peupliers (*Populus tremula x alba*) à des flexions multiples. Master II, Biologie et Environnement.
- Leblanc-Fournier, N., C. Coutand, J. Crouzet, N. Brunel, C. Lenne, B. Moulia and J.L. Julien 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 and Environment*. 31:715-726.
- Lee, D., D.H. Polisensky and J. Braam 2005. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist*. 165:429-444.
- Malone, M. 1993. Hydraulic signals. *Philosophical Transactions of the royal Society of London, Serie B*. 341:33-39.
- Malone, M. 1996. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. In *Advances in Botanical Research*, Vol 22. ACADEMIC PRESS LTD, London, pp. 163-228.
- Martin, L., N. Leblanc-Fournier, J.-L. Julien, B. Moulia and C. Coutand 2010. Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *Journal of Experimental Botany*. 61:2403-2412.
- Martin, L., N. Leblanc-Fournier, W. Azri, C. Lenne, C. Henry, C. Coutand and J.L. Julien 2009. Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein. *Tree Physiology*. 29:125-136.
- Mauch, F., A. Knecl, U. Schaffrath, S. Volrath, J. Gorch, E. Ward, J. Ryals and R. Dudler 1997. Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiology*. 114:1561-1566.
- Mauriat, M. and T. Moritz 2009. Analyses of GA20ox- and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant Journal*. 58:989-1003.

- Michelot, A., C. Guerin, S.J. Huang, M. Ingouff, S. Richard, N. Rodiuc, C.J. Staiger and L. Blanchoin 2005. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell*. 17:2296-2313.
- Mitchell, J.J. and J. Vanstaden 1983. Cytokinins and the Wounding Response in Potato Tissue. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*. 109:1-5.
- Morris, C.E. and U. Homann 2001. Cell surface area regulation and membrane tension. *Journal of Membrane Biology*. 179:79-102.
- Moyle, R., J. Schrader, A. Stenberg, O. Olsson, S. Saxena, G. Sandberg and R.P. Bhalerao 2002. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid Aspen. *Plant Journal*. 31:675-685.
- Nieminen, K., J. Immanen, M. Laxell, L. Kauppinen, P. Tarkowski, K. Dolezal, S. Tahtiharju, A. Elo, M. Decourteix, K. Ljung, R. Bhalerao, K. Keinonen, V.A. Albert and Y. Helariutta 2008. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:20032-20037.
- Niklas, K.J. 1998. Effects of vibration on mechanical properties and biomass allocation pattern of *Capsella bursa-pastoris* (Cruciferae). *Annals of Botany*. 82:147-156.
- Nobel, P.S. 1991. Plants and fluxes. In *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 473-539.
- Passioura, J.B. 1972. The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water. *Australian Journal of agricultural Research*. 23:745-752.
- Pruyn, M.L., B.J. Ewers and F.W. Telewski 2000. Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiology*. 20:535-540.
- Raschke, K. 1970. Stomatal responses to pressure changes and interruptions in the water supply of detached leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiology*. 45:415-423.
- Sivaguru, M., T. Fujiwara, J. Samaj, F. Baluska, Z.M. Yang, H. Osawa, T. Maeda, T. Mori, D. Volkmann and H. Matsumoto 2000. Aluminum-induced 1 \rightarrow 3-beta-D-glucan inhibits cell-

to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology*. 124:991-1005.

Staves, M.P., R. Wayne and A.C. Leopold 1992. Hydrostatic-Pressure Mimics Gravitational Pressure in Characean Cells. *Protoplasma*. 168:141-152.

Tatsuki, M. and H. Mori 1999. Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. *Plant and Cell Physiology*. 40:709-715.

Telewski, F.W. 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*. 93:1466-1476.

Tixier, A. 2010. Mise au point méthodologique de l'analyse de la croissance longitudinale et du transfert d'information chez le peuplier. Master II, Biologie et Environnement.

Volkov, A.G., T. Adesina, V.S. Markin and E. Jovanov 2008. Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant Physiology*. 146:694-702.

Xu, W., M.M. Purugganan, D.H. Polisensky, D.M. Antosiewicz, S.C. Fry and J. Braam 1995. *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell*:1555-1567.

Yi, K.X., C.Q. Guo, D. Chen, B.B. Zhao, B. Yang and H.Y. Ren 2005. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138:1071-1082.

Zimmermann, M.H. 1971. Transport in the phloem. In *Trees. Structure and function* Ed. B.C.L. Zimmerman M.H. Springer Verlag, New York, pp. 221-279.

Zimmermann, M.H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. In *Springer Series in Wood Science* Ed. T.T. E. Springer Verlag, Berlin, p. 143 pp.