



HAL
open science

Mise au point méthodologique de l'analyse de la croissance longitudinale et du transfert d'information chez le peuplier

Aude Tixier

► **To cite this version:**

Aude Tixier. Mise au point méthodologique de l'analyse de la croissance longitudinale et du transfert d'information chez le peuplier. [Stage] Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2) (UBP), FRA. 2010, 29 p. hal-02818149

HAL Id: hal-02818149

<https://hal.inrae.fr/hal-02818149v1>

Submitted on 6 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 : GEPV

Rapport de stage présenté par : Aude Tixier

Sujet : Mise au point méthodologique de
l'analyse de la croissance longitudinale et
du transfert d'information chez le
peuplier

Responsable du stage : Jean-Louis JULIEN

UMR 547 PIAF (Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier)

Université Blaise Pascal

24 Avenue des Landais

63117 Aubière

RESUME

La thigmomorphogénèse se définit comme l'ensemble des réponses des plantes au vent et autres perturbations mécaniques. Elle se caractérise par une réponse morphologique globale résultant d'une diminution de la croissance longitudinale et/ou d'une augmentation de la croissance radiale de la tige. Dans le cadre de cette étude, la croissance longitudinale de *Populus tremula x Populus alba* et ses réponses aux stress mécaniques lésant (brûlure) et non lésant (flexion) ont été mesurées par deux méthodes : l'une directe (avec une règle) et l'autre indirecte (par photographie). Nous avons développé une méthode de mesure de croissance longitudinale du peuplier par photographie, un système de traitement des photographies par analyse d'image et enfin un traitement automatisé des résultats de croissance cumulée par régression linéaire segmentée. Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de gènes mécanosensibles *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH3*, *PtaTCH4*, *PtaACS6* et *PtaJAZ5* par PCR semi quantitative, au niveau de l'apex, après ces sollicitations. Les résultats montrent une induction des gènes *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* et *PtaACS6* 30 minutes après brûlure et de *PtaJAZ5* 1 heure après brûlure. Aucune induction de ces gènes n'est détectée après flexion. Ces résultats physiologiques et moléculaires sont une première étape pour étudier le transfert d'information à longue distance chez le peuplier.

ABSTRACT

The responses of plants to wind and other mechanical perturbations are defined as thigmomorphogenesis. The overall morphological response of thigmomorphogenesis is characterized a decrease in height growth or an increase in radial growth or both. In this study, *Populus tremula x Populus alba* height growth and its responses to flaming or bending are measured with two methods: one directly with a ruler and the other indirectly by photography. We have developed a device of measurement by photography of the poplar's height growth, then a system of image processing and finally an automatic method of segmented regression of the cumulated growth results. Then, time course accumulation of *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH3*, *PtaTCH4*, *PtaACS6* and *PtaJAZ5* transcripts in apex were quantified by real time PCR. The results show an induction of the mécanosensibles genes *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH4* and *PtaACS6* 30 minutes after flaming and *PtaJAZ5* 1 hour after flaming. No significant effect of bending on time course accumulation of transcripts was detected. These physiological and molecular results represent a first step to study long-distance signaling in poplars.

Mot-clés : Thigmomorphogénèse, *Populus tremula x alba*, croissance longitudinale, flexion, transfert d'information, TOUCH

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ACS6 : ACC synthase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNe : ADN copie
ANOVA : analyse de variance
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNr : acide ribonucléique ribosomique
B : plante brûlée
Cm : centimètre
°C : degré Celsius
Cl : clore
CTAB : hexadecyltrimethylammonium bromide
dNTP : déoxy Nucléoside triphosphate
D.O. : densité optique
DTT : DL Dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EF-1 α : elongation factor 1 α
F : plante fléchie
IPTG : isopropyl-beta-thio-galactoside
J : jour du stress
JAZ5 : jasmonate zim domain protein 5
Kb : kilobase
Li : lithium
M : molaire
Min : minute
Mm : millimètre
Na : sodium
nm : nanomètre
Oligo(dT) : oligodéoxythymine
Pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI : Inhibiteur de protéases
PM : poids moléculaire
PVC : Polychlorure de vinyle
PVP : polyvinylpyrrolidinone K30
Qsp : quantité suffisante pour
QR : quantiyé relative de transcripts d'un gène cible par rapport à un gène de ménage
RNase : ribonucléase
RNase OUT : inhibiteur de RNase
RT : transcription reverse
SDS : sodium dodecyl sulfate
SSTE : sodium SDS TrisHCL EDTA
T : plante témoin

TAE : tampon Tris-Acétate-EDTA
Taq pol : Taq polymérase
TCH4 : touch 4 (calmoduline-like protéine)
Tm : température d'hybridation
Tris : tris(hydroxyméthyl) aminométhane
ZFP2 : zinc finger putative transcription factor

Remerciements :

Je remercie Jean-Louis Julien, encadrant de stage, pour la confiance dont il a fait preuve et la liberté d'action qu'il m'a laissé pour la conduite des travaux. Ensuite je remercie Dominique Marcon, photographe, pour ces précieux conseils de prises de vue. Après cela, je remercie Eric Badel, pour ses conseils en analyse d'image, de modélisation ainsi que son implication dans la réalisation des travaux. Je remercie aussi Christelle Boisselet pour ses conseils ainsi que l'approvisionnement et la culture des peupliers. Jérôme Franchel pour les conseils en biologie moléculaire. André Lacoïnte pour ses conseils en statistiques. Sans oublier toute l'équipe pour son accueil et sa convivialité, chacun m'ayant apporté aides et conseils tout au long de la réalisation du stage.

SOMMAIRE

BIBLIOGRAPHIE	1
Thigmomorphogénèse : des réponses physiologiques	1
Mesurer la croissance	3
Thigmomorphogénèse : des réponses moléculaires	4
Variabilité de la sensibilité aux sollicitations mécaniques et phénomène d'acclimatation	5
Des réponses thigmomorphogénétiques distantes et systémiques	5
Signalisation à longue distance via le phloème	7
Signalisation à longue distance via le xylème	8
TRAVAIL EXPERIMENTAL	10
Matériels et méthodes	10
Matériel végétal et conditions de culture	10
Traitements	10
Extraction d'ARN et dosage	11
Transcription Reverse (RT)	11
Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) semi quantitative en temps réel... ..	12
Mesures de croissance longitudinale et prise d'image	13
Traitement et analyse d'image	14
Traitements statistiques des données	14
Résultats	15
Effet d'un stress sur la croissance journalière du peuplier mesurée manuellement	15
Modéliser et traiter les courbes de croissances cumulées mesurées par photographie	15
Effet des traitements sur les durées des phases d'arrêt de croissance diurnes	16
Automatisation du traitement des courbes de croissance cumulées	17
Effet des traitements sur les vitesses de croissance nocturnes	17
Cinétiques d'expression de gènes mécanosensibles au niveau de l'apex après brûlure ou flexion de la tige	18
DISCUSSION	19
Mettre en évidence et caractériser une réponse de croissance longitudinale à la flexion ..	19
Des gènes marqueurs du transfert d'information	21
Conclusion et perspectives	23
REFERENCES	25

INTRODUCTION

Les plantes terrestres développent généralement des structures fixées pour intercepter la lumière, source d'énergie photosynthétique. Leur surface est développée au détriment de leur volume. Dans le cas de plantes pérennes telles que les arbres, ce développement en surface conduit à de grandes architectures ramifiées supportées par un seul tronc (Hallé, 1987). De telles architectures se maintenant en croissance à travers les siècles, doivent percevoir leur environnement mécanique direct. Elles perçoivent la gravité (Knight, 1806), leur propre poids qui organise l'allométrie et les propriétés mécaniques des tissus (Telewski, 2006) ainsi que les variations de poids induites par la charge en fruit (Alméras *et al.*, 2004). De telles forces mécaniques peuvent ainsi être qualifiées d'internes (Telewski, 2006).

A ces forces internes s'ajoute un environnement fluctuant et contraignant que l'immobilité des plantes oblige à percevoir et répondre. Ainsi, la compétition de croissance pour la lumière en forêt est cruciale pour la survie mais doit être équilibrée avec le risque de devenir mécaniquement instable (Fournier *et al.*, 2006). En effet, la survie des jeunes arbres en forêt est fortement dépendante de la régulation du rapport hauteur/diamètre du tronc, et les espèces héliophiles doivent atteindre la canopée le plus rapidement possible tout en résistant aux contraintes mécaniques internes et externes (Coutand *et al.*, 2009). Le vent est un facteur de contrainte essentiel au développement des plantes et particulièrement des arbres, son impact augmentant avec la taille et la surface foliaire de l'individu (James *et al.*, 2006). Ce stress présente une nature multicomposante (fréquence, force, vitesse, durée) et très fluctuante (Nuutinen, 2006). Des épisodes de tempêtes peuvent totalement affecter la structure, le fonctionnement et la productivité d'une forêt et ainsi être la source de grandes pertes économiques en sylviculture. La tempête de décembre 1999 a détruit environ $180 \times 10^6 \text{ m}^3$ de bois en Europe, et celle de 2004 a détruit $70 \times 10^6 \text{ mm}^3$ majoritairement dans le sud de la Suède (Nuutinen, 2006). Le rapport du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) de 2009 prévoit un climat de plus en plus fluctuant avec une augmentation de la fréquence des épisodes de tempêtes. C'est pourquoi, il devient important de comprendre les mécanismes de réponses des arbres à l'environnement mécanique et de renforcer la résilience des forêts au vent.

Les forces mécaniques externes perçues par un organisme sont multiples : vent, passage d'animaux, taille, blessure, toucher (Telewski, 2006). Des stress thermiques comme le froid ou la brûlure présentent aussi des composantes mécaniques. Ils génèrent notamment

des variations de pression de turgescence des cellules. On peut différencier les stress lésants, qui conduisent à des dégradations de la structure des tissus ou à des morts cellulaires, des stress non lésants qui maintiennent l'intégrité des tissus (Julien, 1994). Les expérimentations empiriques pour mimer l'effet du vent sur les plantes se basent sur des traitements de flexions des tiges, ou encore des cultures en environnement contrôlé comme des tunnels à vent (Nuutinen, 2006).

Le laboratoire UMR PIAF étudie l'effet des stress abiotiques chez les arbres, avec pour modèle d'étude *Populus tremula x Populus alba*. Au sein de l'équipe MECA, Coutand *et al.* (2000) ont développé un système de flexion contrôlée qui permet de quantifier les composantes mécaniques du stress et de les corrélérer aux réponses de thigmomorphogénèse. Jaffe (1976) définit la thigmomorphogénèse comme l'ensemble des réponses physiologiques, biochimiques et morphologiques des plantes au vent et aux autres perturbations mécaniques. La thigmomorphogénèse se caractérise par une réponse morphologique globale de réduction du rapport entre la hauteur et le diamètre de la tige résultant d'une diminution de la croissance longitudinale et/ou d'une augmentation de la croissance radiale de la tige (Telewski 1986, 1998). Ces réponses de croissance sont associées à des modifications de l'allocation de biomasse entre partie aérienne et souterraine (Coutand *et al.*, 2009). Des réponses physiologiques ainsi coordonnées dans des organes à distance traduisent un transfert d'information (Malone, 1996).

La composante principale de la flexion perçue par les plantes est la somme des déformations (Coutand *et al.*, 2000). Elle a été corrélée aux réponses d'augmentation de croissance radiale chez le peuplier ainsi qu'à l'expression de gènes mécanosensibles dans la zone fléchie (Coutand *et al.*, 2009). En revanche, les réponses de croissance longitudinale du peuplier n'ont pas encore été étudiées. Des réponses physiologiques à distance du lieu de stress suggèrent un transfert d'information. Notre étude propose une caractérisation des réponses de croissance longitudinale du peuplier à une flexion. La sollicitation mécanique de flexion sera comparée à une brûlure, qui peut représenter un témoin positif de stress induisant une diminution de croissance chez le peuplier. Les résultats obtenus permettront d'étudier le transfert d'information, sa cinétique ainsi que sa nature, afin de comprendre de manière intégrative les mécanismes sous-jacents à la thigmomorphogénèse.



Figure 1 : *Picea engelmannii* présentant un port en drapeau généré par de forts vents unidirectionnels. Source : Dave Powell, USDA Forest Service, www.forestryimages.org.



Figure 2 : Mouvements de thigmonastie chez *Mimosa pudica* (Sensitive). Les folioles sont ouvertes avant stimulation mécanique (a) et se ferment après toucher (b) (Braam, 2005).

BIBLIOGRAPHIE

La thigmomorphogénèse a été définie comme l'ensemble des réponses physiologiques, biochimiques et morphologiques des plantes aux perturbations mécaniques (Jaffe, 1976). Elle se caractérise par une réponse morphologique globale de réduction du rapport entre la hauteur et le diamètre de la tige (Telewski, 1998). Cette réponse limite la rupture d'un axe par le vent, en réduisant la surface de frottement et/ou en augmentant la résistance mécanique (Pruyn, 2000). La thigmomorphogénèse peut générer des ports en drapeau (Figure 1) en conditions de vents violents et unidirectionnels (Telewski, 2006). Elle se traduit aussi généralement par des modifications des tissus conducteurs et des pertes de feuilles (Telewski, 1998), ainsi que par de nombreuses réponses physiologiques et moléculaires (Braam, 2005 ; Kern, 2005).

Les premières réponses physiologiques au toucher mises en évidence ont été des mouvements de réponse observables à l'œil nu : les thigmonasties. Les thigmonasties des feuilles de *Mimosa pudica* (Figure 2) et des plantes carnivores (Pilet, 1953) sont étudiées dès 1875 par Darwin. Ces mouvements résultent de baisse de pression de turgescence au niveau d'organes spécialisés, les pulvini. Ils sont localisés à la base des pétioles (Braam, 2005). Depuis, les études portant sur les effets des sollicitations mécaniques externes sur la croissance des plantes ont concerné un nombre important d'espèces végétales, notamment les gymnospermes (Pruyn, 2000), les angiospermes herbacées (Doare, 2004) et ligneuses (Martin *et al.*, 2009).

Thigmomorphogénèse : des réponses physiologiques

De nombreux travaux ont montré qu'en condition naturelle, la croissance longitudinale est augmentée chez les plantes protégées du vent. Ils consistaient à comparer la croissance d'un lot de plantes tuteurées à celle d'un lot de plantes laissées libres de mouvement. Les plantes tuteurées présentaient une croissance longitudinale plus grande. Ce phénomène a été mis en évidence chez des gymnospermes ligneux : *Pinus taeda* (Telewski, 1986), *Abies fraseri* (Telewski, 1986), chez des angiospermes herbacées: *Médicago sativa* (Doare *et al.*, 2004) et ligneux : *Ulmus americana* (Telewski, 1998), *Populus trichocarpa x deltoides* (Kern, 2005). Des expériences consistant à appliquer des sollicitations mécaniques contrôlées en laboratoire corroborent les résultats obtenus en condition naturelle chez *Arabidopsis thaliana* (Braam, 2005) et *Lycopersicon esculentum* (Coutand *et al.*, 2000). Jaffe (1976) rapporte qu'un stress mécanique induit un arrêt de croissance longitudinale dès 6 minutes après son application chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Coutand *et al.* (2000) présentent des résultats

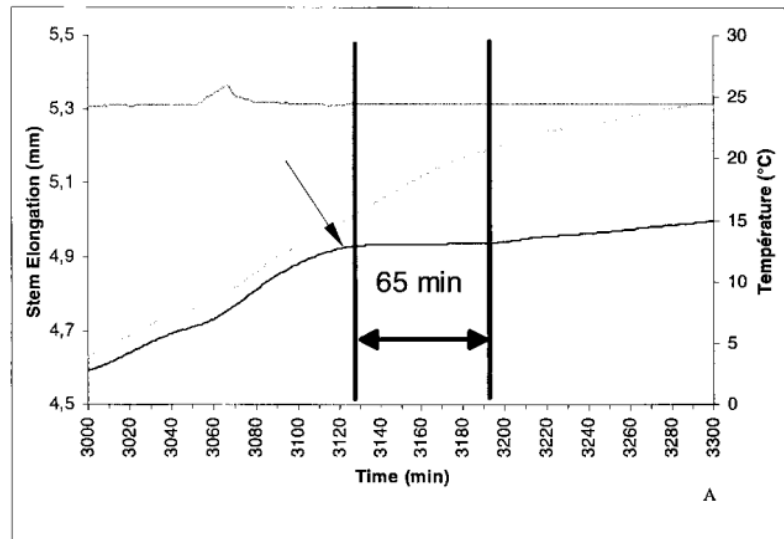


Figure 3 : Réponse de croissance longitudinale d'une tige de tomate (*Lycopersicon esculentum*) après une flexion contrôlée. La flèche indique le moment de la sollicitation mécanique. La phase d'arrêt de croissance est délimitée par deux barres noires, (d'après Coutand *et al.*, 2000).

similaires avec un arrêt de croissance induit dès 8.3 +/- 3.7 minutes après une flexion de la tige chez la tomate. L'arrêt dure en moyenne 60 minutes avant une reprise de croissance (Figure 3).

De plus, le vent induit généralement une augmentation de la croissance radiale (Telewski 1998, Coutand *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2009). L'augmentation de croissance radiale est associée à une augmentation de la rigidité en flexion ainsi qu'à des changements des propriétés mécaniques des tiges. Leur élasticité, mesurée par le module de Young est augmentée (Telewski, 1998). Ces variations des propriétés mécaniques des tiges peuvent s'expliquer par des modifications de l'anatomie des vaisseaux dans le nouveau bois mis en place au cours de l'augmentation de la croissance radiale. Ainsi, chez le haricot, une augmentation de la production de tissu de soutien a été mise en évidence (Jaffe *et al.*, 1984). Chez le peuplier, le nombre et le diamètre des vaisseaux diminuent dans le bois formé après flexion (Kern *et al.*, 2005). Ce bois particulier formé chez les ligneux suite à des flexions répétées est nommé bois de réaction par les auteurs (Scurfield, 1973). Chez les gymnospermes, le bois de réaction se forme généralement sur la face comprimée des tiges inclinées. Ce tissu transformé exerce alors une pression longitudinale qui tend à redresser l'axe. On parle de bois de compression (Scurfield, 1973). Chez les dicotylédones, le bois de réaction est appelé bois de tension. A l'opposé du bois de compression, il se forme sur la face tendue des tiges inclinées et exerce une force de traction longitudinale pour redresser l'axe (Telewski, 2006).

Les réponses de croissance au vent sont couplées à des phénomènes de réallocation de biomasse, de perte de feuilles, de modification de la conductance hydraulique, de blocage du phloème par des dépôts de callose (Telewski, 2006). Des processus physiologiques indirectement liés peuvent même être affectés par des sollicitations mécaniques. Ainsi, des décalages de floraison et de dormance peuvent être induits, ou encore des phénomènes de sénescence, d'altération des concentrations chlorophylliennes, de résistance à la sécheresse, ou d'ouverture de stomates et de résistance aux pathogènes (Braam, 2005).

A l'aide d'une approche biomécanique, Coutand *et al.* (2000) ont proposé que la composante mécanique principale, de la flexion, perçue par la plante est la somme des déformations. Les recherches étudiaient la réponse de croissance longitudinale de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) à une flexion contrôlée. Tous les paramètres mécaniques de la flexion étaient contrôlés et déterminés. La réponse de croissance observée se traduit par un arrêt de croissance d'une durée très peu variable d'environ 1 heure (Figure 3) suivi d'une

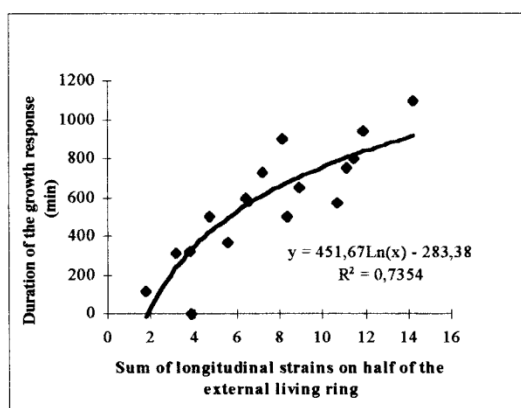


Figure 4 : Relation de corrélation entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations appliquée à une tige de tomate. Relation logarithmique avec coefficient de Pearson $R^2=0.73$, (d'après Coutand *et al.*, 2000).

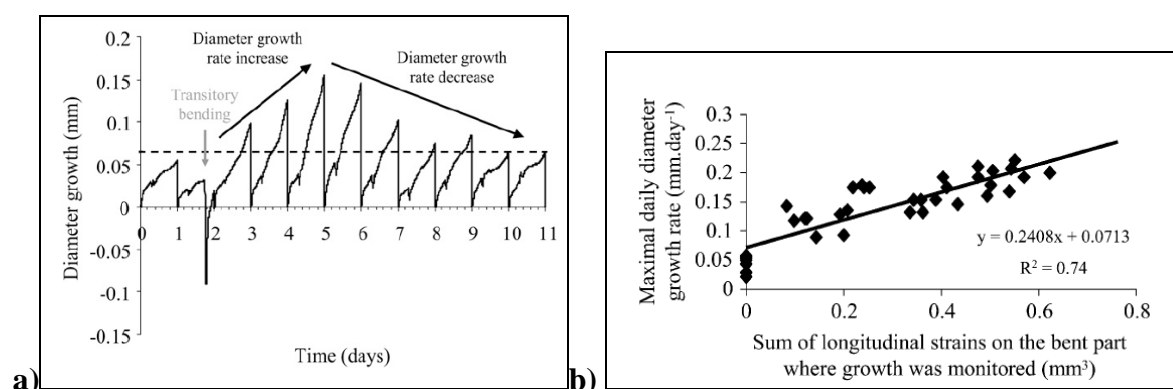


Figure 5: Réponse d'augmentation de croissance radiale à une flexion contrôlée de la tige chez le peuplier (a) Effet d'une flexion sur la croissance radiale du peuplier. Avant flexion le taux de croissance radiale est stable, la flexion (flèche grise verticale) induit une augmentation de la croissance radiale pendant 3 jours puis le taux de croissance diminue jusqu'à atteindre un taux basal après 7 jours. **b)** Corrélation linéaire entre la vitesse maximale de croissance radiale journalière et la somme des déformations appliquée à la tige. Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0.74, (d'après Coutand *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Variabilité interspécifique des réponses de croissance au traitement de flexion chez cinq espèces ligneuses de forêts tropicales, (d'après Coutand *et al.*, 2009).

Species	Treatment	Growth in height (cm)	Growth in diameter (mm)
<i>Bauhinia guianensis</i>	Control	31.2 (± 36.5)	1.7 (± 0.6)
	Bent	18.2 (± 15.7) ^{ns}	2.2 (± 0.6)*
<i>Eperua falcata</i>	Control	9.1 (± 9.9)	0.6 (± 0.2)
	Bent	10.3 (± 10.0) ^{ns}	0.9 (± 0.5) ^{ns}
<i>Eperua grandiflora</i>	Control	3.9 (± 4.1)	0.5 (± 0.3)
	Bent	6.1 (± 3.6) ^{ns}	0.9 (± 0.3)*
<i>Symphonia globulifera</i>	Control	2.95 (± 14.6)	0.7 (± 0.2)
	Bent	5.5 (± 2.2) ^{ns}	1.6 (± 0.6)*
<i>Tachigali melinonii</i>	Control	9.1 (± 2.2)	0.7 (± 0.6)
	Bent	8.2 (± 5.2) ^{ns}	1.6 (± 0.3)*

phase de reprise de croissance jusqu'à atteindre une vitesse de croissance identique à celle mesurée avant la sollicitation mécanique. La réponse physiologique (durée de réponse de croissance) a été confrontée avec chaque composante mécanique du stress imposé et une relation de corrélation avec la somme des déformations (Figure 4) a été mise en évidence, suggérant que la composante mécanique perçue par la plante serait alors la déformation. Ce modèle de mécanoperception est particulièrement intéressant car il permet de quantifier le stress appliqué.

Cette hypothèse a ensuite été validée pour les réponses d'augmentation de croissance radiale de la tige après flexion chez le peuplier (Coutand *et al.* 2009). Avant flexion, le rythme et l'amplitude de la croissance radiale sont stables. La flexion induit une augmentation de la croissance radiale pendant 3 jours puis le taux de croissance diminue jusqu'à atteindre un niveau basal après 7 jours (Figure 5a). Comme pour la croissance longitudinale chez la tomate, il a été mis en évidence une bonne corrélation entre la vitesse maximale de croissance radiale journalière et la somme des déformations appliquées à la tige (Figure 5b).

Une étude des réponses de croissance de 5 espèces ligneuses tropicales menée par Coutand *et al.* (2009) montre que le modèle somme des déformations s'applique à un grand nombre d'espèces. Il existe ainsi une variabilité interspécifique des réponses de croissance (Tableau 1). La réponse de croissance longitudinale n'est pas significative chez les 5 espèces alors que 4 espèces présentent des réponses de croissances radiales significatives. De plus, Pruyn (2000) montre une variabilité intraspécifique des réponses de croissance entre deux peupliers hybrides *Populus trichocarpa x Populus deltoïdes*. Si l'hybride 11-11 montre une diminution de croissance longitudinale induite par une flexion, l'hybride 47-174 montre une augmentation de croissance longitudinale (Tableau 2). Une telle variabilité intraspécifique et interspécifique des réponses de croissance suggère qu'avant de caractériser une cinétique de transfert d'information de la zone fléchie à l'apex, il est nécessaire de caractériser et de démontrer la réponse de croissance longitudinale chez le peuplier *Populus tremula x Populus alba*.

Mesurer la croissance

Pour identifier et mettre en évidence des réponses de croissance, il faut mesurer la croissance. Il existe diverses méthodes pour mesurer la croissance d'un organe et pour mettre en évidence le déplacement qui en résulte. Les méthodes directes qui consistent par exemple à inscrire sur l'organe des traits à l'encre et à leurs déplacements, on encore les mesures manuelles à l'aide de mètres (Pilet, 1953). Ces méthodes nécessitent un contact avec la plante.

Tableau 2 : Variabilité intraspécifique des réponses de croissance au traitement de flexion chez le peuplier *Populus trichocarpa x deltoïdes*, (d'après Pruyn, 1998).

Property	Hybrid 11-11			Hybrid 47-174			Interaction
	Control	MP	P-value	Control	MP	P-value	P-value
<i>Morphological properties</i>							
Stem diameter growth, MP _{par} axis (mm)	3.32 ± 0.18	4.17 ± 0.18	0.002	3.34 ± 0.18	4.74 ± 0.18	0.0001	0.083
Stem diameter growth, MP _{perp} axis (mm)	3.35 ± 0.17	4.03 ± 0.17	0.008	3.24 ± 0.17	4.51 ± 0.17	0.0001	0.162
Roundness index (MP _{par} /MP _{perp} - 1)	-0.007 ± 0.21	0.036 ± 0.21	-	-0.032 ± 0.21	0.053 ± 0.21	-	-
P _r > T	0.2891	0.0002	-	0.4454	0.0005	-	-
Stem height growth (cm)	83.3 ± 3.61	77.6 ± 3.61	-	94.6 ± 3.61	104.4 ± 3.61	-	0.039
Stem height to MP _{par} growth ratio	25.5 ± 1.01	18.6 ± 1.01	0.0001	29.7 ± 1.01	22.1 ± 1.01	0.0001	0.742

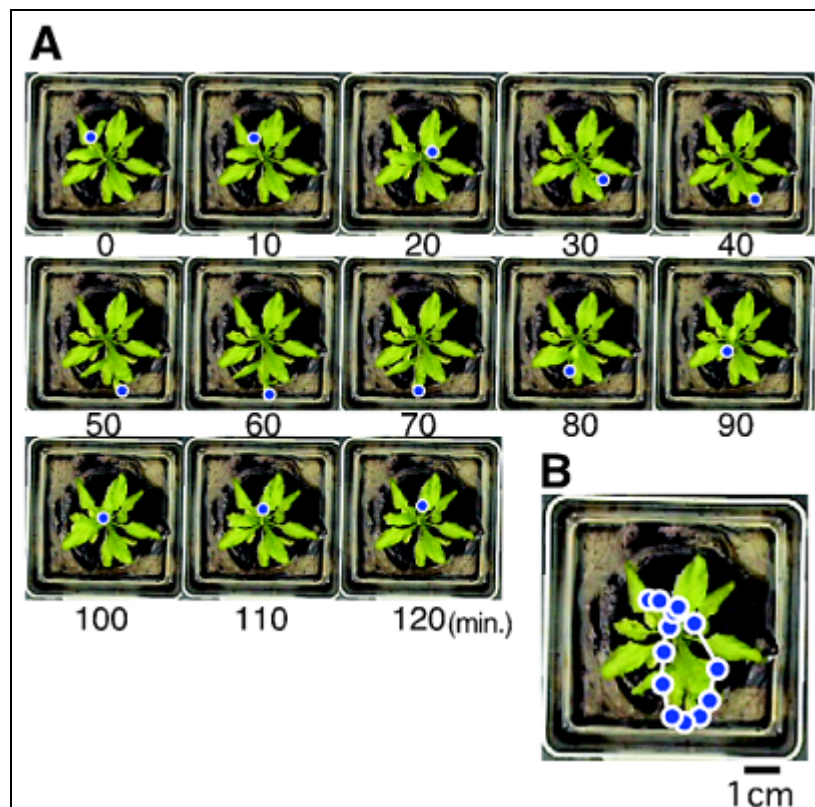


Figure 6 : Circumnutation chez *Arabidopsis thaliana*. Acquisition de donnée par analyse d'image(A). La nutation complète dure 120 minutes. (B) trajectoire de la nutation. (d'après Niinuma, 2005).

Les méthodes indirectes sont réalisées avec des capteurs de déplacement (ou auxanographes) (Coutand, 1999, Fuad-Hassan, 2008) ou par mesure photographique (Figure 6). Ces mesures sont plus précises et la mesure de croissance par photographie évite de toucher les plantes. Les mouvements de croissance résultent de la prolifération cellulaire (mitose) et de l'élongation cellulaire (Pilet, 1953, Fuad-Hassan, 2008). Pour une élongation maximale, les cellules subissent une prolifération minimale (Fuad-Hassan, 2008). La croissance d'une tige peut être marquée de mouvements hélicoïdaux dits de circumnutation (Pilet, 1953). Ces mouvements ont été mis en évidence chez les plantes volubiles qui présentent des circumnutations très marquées. Ces mouvements résultent d'un allongement inégal entre deux faces opposées ainsi que des variations réversibles de longueurs de cellules (Niinuma, 2005). Les circumnutations sont ainsi associées à des différences de pression de turgescence et de concentration ionique entre la face concave et convexe de la tige (Niinuma, 2005)

Thigmomorphogénèse : des réponses moléculaires

Un grand nombre de signaux intra et inter cellulaires tels que des hormones, messagers secondaires et des potentiels électriques ont été mis en évidence dans les modifications de morphogénèse suite à des sollicitations mécaniques (Braam, 2005).

Tout d'abord, la perception du stimulus mécanique (mécanoperception) se réaliserait au niveau de chaque cellule, à l'interface cytosquelette-membrane plasmique-paroi (CPMCW) (Telewski, 2006). La différence de pression au niveau de l'interface CPMCW fournirait un signal physique. Ensuite, cette perception serait suivie en quelques secondes par des potentiels d'action et des variations de gradients électrochimiques de part et d'autre des membranes. Après cela, un blocage du flux du phloème, une augmentation de la concentration interne en Ca^{2+} et la production d'espèces réactives de l'oxygène participeraient à la transduction du signal conduisant à l'expression de gènes TOUCH (TCH) (Telewski, 2006). Les gènes TCH sont exprimés rapidement (30 minutes) et fortement après toucher et ont été mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* par technique de microarray. 589 gènes, soit 2.5% du génome, ont ainsi montré des inductions d'expression après sollicitations mécaniques (Braam, 2005). TCH1 code une calmoduline (CAM2), TCH2 et TCH3 codent des protéines calmodulines like (CML24 et CML12 respectivement) et TCH4 code une xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XTH22). D'autres gènes codant pour des enzymes de modification et synthèse de paroi, des kinases, des facteurs de transcription ainsi que des protéines de défense contre les pathogènes présentent des profils de TCH (McCormack, 2006). Martin *et al.* (2009) a identifié chez *Populus tremula x Populus alba* un facteur de

Temps après l'application de la sollicitation	Réponses cellulaires	Réponses de croissance
1 à 10 s	Formation d'un potentiel d'action Ouverture des canaux mécano-	
1 à 2 min	Entrée de Ca ²⁺ dans le cytosol Production d'espèces activées de l'oxygène Blocage du transport phloémien	
2 à 8 min	Expression des gènes <i>Pta-ZFP2</i> codant une protéine C2H2-ZFP et <i>Pta-TCH2</i> codant une CML	Arrêt de la croissance cambiale et de la croissance longitudinale
10 à 30 min	Expression de gènes codant des calmodulines (gènes <i>TOUCH</i>) Expression de gènes de la biosynthèse de l'éthylène (<i>ACC synthase</i>)	
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>	
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 à un niveau d'éthylène basal	

Figure 7 : Cascade des réponses cellulaires et physiologiques observées suite à une sollicitation mécanique, (d'après Telewski 2006, complété par Martin, 2009).

transcription à doigt de zinc, *Pta-ZFP2*, qui présente un profil de TCH. Il est exprimé rapidement et spécifiquement après flexion (10 minutes) et présente une induction mécano-inductible et tissu spécifique. D'autres gènes TCH sont impliqués dans des voies de biosynthèse d'hormones. Ainsi les hormones éthylène et jasmonate sont impliquées dans la signalisation du stress mécanique (Wasternack, 2005, Zhang, 2008, Glauser, 2009).

Finalement, il a été proposé une cinétique de la cascade des réponses moléculaires au cours de la transduction du signal mécanique (Telewski, 2006 ; Martin *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, il n'existe toutefois pas suffisamment de données pour comprendre les interactions entre ces différents partenaires moléculaires (Figure 7). Il faut souligner que le modèle de mécanoperception prenant en compte la somme des déformations (Coutand *et al.*, 2000) s'applique aussi aux réponses moléculaires (Figure 8).

Variabilité de la sensibilité aux sollicitations mécaniques et phénomène d'acclimatation

Le phénomène d'acclimatation des plantes au vent doit être pris en compte pour l'étude des réponses de croissance (Martin *et al.*, 2010). Telewski (1998) montre des réponses dose-dépendante à la flexion chez *Ulmus americana* avec une inhibition des réponses au-delà d'une certaine quantité de stress appliquée. Ainsi, après un certain nombre de flexions, les arbres stimulés ne répondent plus au stress. L'installation de plantes régénérées *in vitro* en culture hydroponique représente une sollicitation mécanique. Martin (2010) montre que l'effet de la stimulation mécanique sur la croissance radiale induit par l'installation n'est plus visible après 4 jours (Figure 9). Il sera donc souhaitable de respecter ce délai avant d'appliquer une sollicitation mécanique afin d'éviter les biais générés par une acclimatation des plantes et une inhibition du système de réponse. Les phénomènes d'acclimatation sont aussi observables au niveau moléculaire (Figure 10). Les gènes mécanosensibles *Pta-ZFP2*, *Pta-ACS6*, *Pta-TCH4*, et *Pta-TCH2* montrent des expressions relatives plus faibles après plusieurs flexions répétées qu'après une seule flexion.

De plus, Garner (1996) montre une variation de la sensibilité de la tomate aux sollicitations mécaniques avec le rythme circadien. Les sollicitations seront donc systématiquement appliquées vers 10 heures le matin.

Des réponses thigmomorphogénétiques distantes et systémiques

Les réponses de croissance longitudinale à un stress appliqué à distance mettent en évidence une signalisation à longue distance entre organes. Ce transfert d'information devient d'autant plus spectaculaire à l'échelle d'un arbre où des informations peuvent être transmises sur des mètres de distance avec des réponses apparaissant dès quelques minutes (Coutand *et*

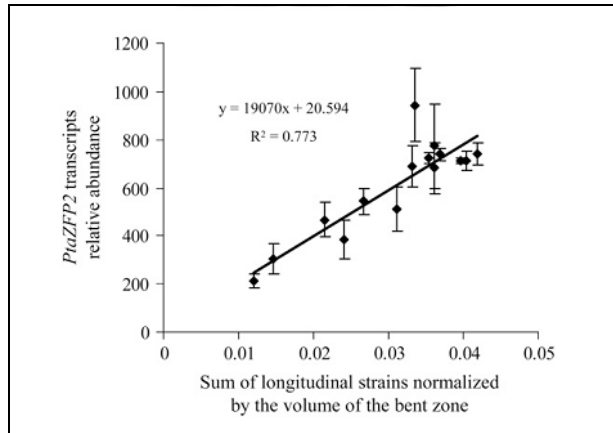


Figure 8 : Relation entre le taux d'expression de *Pta-ZFP2* et la somme des déformations longitudinales normalisées par le volume de tige fléchié, (d'après Coutand *et al.*, 2009).

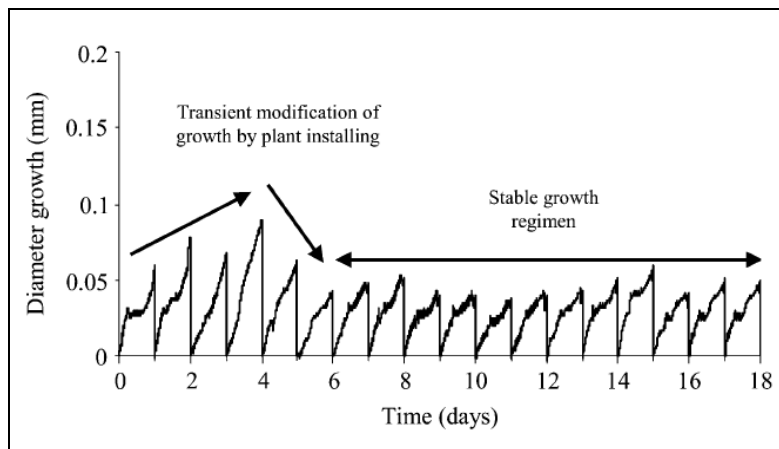


Figure 9 : Effet de l'installation de peuplier sur la croissance radiale du peuplier. (La plante retrouve une croissance radiale normale 4 jours après installation, (d'après Martin *et al.*, 2010).

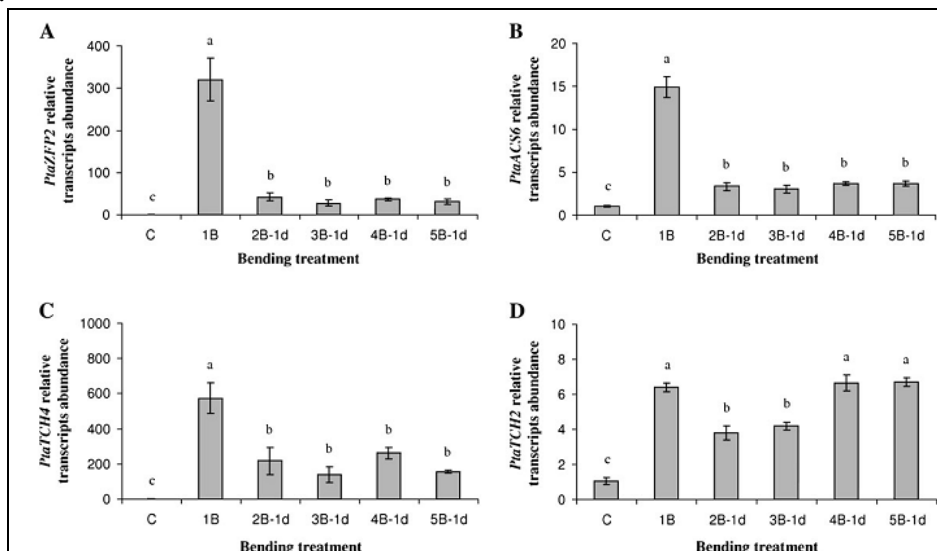


Figure 10 : Expression relative des gènes *PtaZFP2* (A), *PtaACS6* (B), *PtaTCH4* (C), et *PtaTCH2* (D) après des traitements de flexions répétées. Les échantillons sont prélevés après 1 flexion (1B) ou après la dernière flexion appliquée. La fréquence des flexions est de une par jour. Les profils d'expressions montrent une acclimatation au niveau moléculaire. (d'après Martin *et al.*, 2010).

al., 2000). En effet, la communication entre les organes est essentielle au développement coordonné des plantes et à leur adaptation aux variations de l'environnement (Zimmermann, 2009).

Des réponses éloignées du site de perception du stress ont été mises en évidence. Après une blessure localisée, Farmer *et al.* (1992) montrent une accumulation systémique d'inhibiteur de protéinases (PI) chez la tomate. Le phénomène a été mis en évidence chez le tabac mais aussi le peuplier (Malone, 1996). Dans le cas de la tomate, l'induction de l'expression des PI de manière systémique est détectée dès 20 minutes. Il est intéressant de noter que la blessure est de nature lésante (Julien *et al.*, 1992) et que de telles accumulations systémiques de PI n'ont pour l'instant pas été mises en évidence après sollicitation mécanique non lésante telles que des traitements de flexions. Toutefois, Roux *et al.* (2008) montrent que l'application d'un champ électromagnétique de 900MHz pendant 10 minutes sur une seule feuille induit une accumulation systémique de PI chez la tomate. Une grande variété de réponses éloignées du site de perception après blessure ont été mises en évidence tels que des fermetures de stomates, des phénomènes électriques de surface ainsi qu'une augmentation de la pression de turgescence (Malone, 1996). La SAR (Systemic Acquired Resistance) résistance systémique d'une plante à un pathogène après infection locale, est un autre exemple de transfert d'information à longue distance.

La littérature s'accorde sur le fait que le transfert d'information à longue distance est majoritairement réalisé par les tissus vasculaires soit le phloème et le xylème (Zimmermann, 2009, Neumann, 2007, Fromm, 2007). Certains signaux sont volatiles comme l'éthylène et sont libérés dans l'atmosphère (Zimmermann, 2009). Le message est alors non seulement transmis aux différents organes de l'individu mais aussi aux plantes voisines. L'éthylène a été mise en évidence dans la thigmomorphogénèse et ses gènes de biosynthèse présentent des profils de TCH. Lors de nos expérimentations, les plantes témoins devront donc être séparées physiquement des plantes stressées afin de limiter un transfert d'information. Toutefois, des études de mutants suggèrent que si l'éthylène semble avoir un rôle dans l'augmentation de croissance radiale de la thigmomorphogénèse, la production d'éthylène n'est pas nécessaire à la diminution de croissance longitudinale (Braam, 2005). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la réponse de croissance intervient avant le pic de production de l'éthylène (Coutand, 1999). La production d'éthylène serait alors une des réponses de thigmomorphogénèse et non le signal primaire transmis à l'apex (Braam, 2005).

Comprendre la signalisation à longue à distance représente un challenge scientifique majeur (Zimmermann, 2009). La nature du signal transmis après sollicitation mécanique n'est pas encore élucidée mais trois hypothèses principales sont proposées et sont certainement couplées dans le transfert d'information et la coordination des réponses physiologiques. Ainsi, le signal pourrait être de nature chimique (hormones, protéines, acides nucléiques) et être transmis par le phloème ou le xylème. Le signal pourrait être encore de nature physique : hydraulique par des variations de pression au niveau du xylème, ou électrique, généré par des variations de gradients électrochimiques et transmis au niveau des vaisseaux conducteurs.

Signalisation à longue distance via le phloème

Le transfert à longue distance de molécules telles que des métabolites, hormones, ou des sucres par le phloème a été particulièrement étudié (Kehr, 2007). Le phloème représente le siège de transport de signaux chimiques le plus évident. Son transport peut être basipète comme acropète avec une vitesse comprise 0.1 et 1mm par seconde (Malone, 1996). Le transfert à longue distance via le phloème, des hormones comme l'auxine, des gibbérellines, les cytokinines, d'acide abscissique et des jasmonates a été mis en évidence (Kehr, 2007). Les jasmonates sont des hormones impliquées dans la thigmomorphogénèse. Zhang (2008) étudie l'implication des jasmonates dans les réponses de croissance à la blessure chez *Arabidopsis thaliana*. Il montre que des traitements de blessures répétées induisent une diminution de croissance de 50% et une augmentation de la production des jasmonates. Des plantes présentant des mutations sur les gènes de biosynthèse ou de réponse aux jasmonates ne présentaient pas de réponses de croissance aux blessures. La diminution de croissance suite aux blessures serait induite par une inhibition de la mitose. Ensuite Glauser (2009) estime la vitesse de propagation du signal conduisant à une accumulation systémique d'acide jasmonique après blessure chez *Arabidopsis thaliana*. L'accumulation de jasmonate sur le site de blessure est réalisée en 30 secondes et on observe une accumulation dans les feuilles distales au bout de 120 secondes. Ces travaux, dont les résultats sont cohérents avec des expériences de greffes chez la tomate, plaident pour les jasmonates en tant que signal systémique après blessure. Les greffes étaient réalisées avec des mutants déficients en production de jasmonates ou insensibles aux jasmonates (Wasternack, 2006). La réponse systémique nécessitait une perception des jasmonates dans les feuilles distales mais ne nécessitait pas de biosynthèse, alors que la production locale sur le site de blessure était nécessaire. Ce modèle ne peut toutefois pas être directement transposé aux sollicitations mécaniques, différentes de part leur nature non lésante.

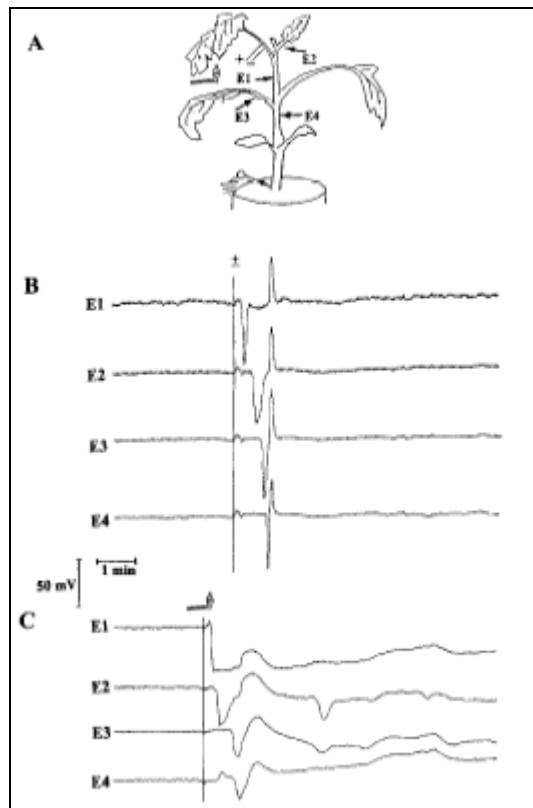


Figure 11 : Potentiel d'action (AP) et onde lente (VP) chez la tomate. (A) Matériel végétal et position des électrodes. (B) Potentiel d'action induit par stimulation électrique. (C) Onde lente induit par brûlure, (d'après Stankovic, 1996).

D'autres molécules sont véhiculées dans le phloème : une signalisation par les sucre (sugar sensing) a été ainsi mise en évidence (Rolland, 2006). La systémine, hormone peptidique est aussi transportée via le phloème (Neumann, 2007). De plus, les transports et mouvements d'ARN par le phloème ont été récemment démontrés (Kehr, 2007). Les petits ARN, en particulier, semblent jouer un rôle clé dans la coordination de processus physiologiques tels que la défense contre les pathogènes, le gène silencing, la régulation du développement et la répartition de l'allocation des nutriments (Kehr, 2007).

Le phloème est aussi un tissu de transmission de signaux électriques. En effet, une des réponses précoces des plantes supérieures à des stimulations externes est le déclenchement et la propagation d'une variation de potentiel électrique transmembranaire qui présente des caractéristiques différentes suivant la nature (lésante ou non) de l'agent stimulant (Julien, 1992). Quand le stimulus ne provoque pas de lésions, les cellules déclenchent un potentiel d'action (Figure 11B) qui se propage à une vitesse constante de 1 cm par seconde, avec une durée de 20 secondes et une période réfractaire de 2 heures (Julien, 1992). Bien que présentant un fort décrétement, le potentiel d'action est véhiculé à l'échelle de toute la plante via le phloème et est maintenu par des boucles de courants locaux (Fromm, 2007). Il suit une loi du tout-ou-rien (Yan, 2008). Sa phase de dépolarisation est liée à des influx de Ca^{2+} et des efflux de Cl^- et sa phase de repolarisation est associée à un efflux de K^+ (Lautner, 2005).

Signalisation à longue distance via le xylème

Le xylème peut lui aussi être le siège de transport de signaux chimiques au sein de la plante. Ses propriétés mécaniques offre des possibilités de transport de solutés très rapide (Malone, 1996). Cependant, la vitesse de transport dans le xylème est très variable et est fortement dépendante des conditions climatiques. Elle repose sur la théorie de la tension-cohésion des molécules d'eau (Malone, 1996). D'après la littérature, la vitesse de transport varierait entre 1 mm et 200 mm par seconde et serait nulle à 100% d'humidité atmosphérique. Des transports d'éthylène, d'acide abscissique, et de protéines (Neumann, 2007) ont été mis en évidence dans le xylème.

La signalisation à longue distance par le xylème peut aussi être de nature hydraulique. Un signal hydraulique peut être généré par une variation de pression hydrique transmise dans le continuum vasculaire que forme le xylème (Malone, 1994). Le front d'une vague de pression se déplacerait dans le xylème à une vitesse d'environ 1500 mètres par seconde soit approximativement la vitesse du son. Le signal serait perçu par un changement significatif de pression de turgescence dans les cellules environnantes. Sur la base du modèle de

mécanoperception détaillé précédemment, elle conduirait à une transduction moléculaire du signal mécanique (Malone, 1996). Une diminution du potentiel hydrique du xylème, causé par une diminution de la disponibilité en eau dans le sol induit une fermeture des stomates quasi immédiate. Cette fermeture est générée après perception d'une baisse de la pression de turgescence des cellules adjacentes (Malone, 1996).

Un stimulus lésant déclenche une variation de potentiel électrique composée d'un potentiel d'action suivi d'une onde lente (Figure 11C). L'onde lente se propage à une vitesse de 1 mm par seconde dans le xylème et présente un faible décrétement (Yan, 2008). Sa phase de dépolarisation est liée à des influx de Ca^{2+} et sa phase de repolarisation est associée à un efflux de H^+ (Julien, 1994). L'onde lente est transmise sur des longues distances via le xylème et peut traverser des tissus morts (Julien, 1994). Son amplitude varie en fonction de l'intensité du stress. Récemment, la littérature suggère que l'onde lente soit associée au signal de variation de pression xylémienne (Stalberg, 2005).

Le vecteur de la signalisation à longue distance et la nature du signal sont toujours inconnus dans le cas de la thigmomorphogénèse. Notre étude propose une mise au point méthodologique de l'analyse des réponses de croissance longitudinale et du transfert d'information chez le peuplier. Son principal objectif sera de mettre en évidence des réponses physiologiques et moléculaires à un stress lésant (brûlure) ou non lésant (flexion) au niveau de l'apex chez le peuplier.

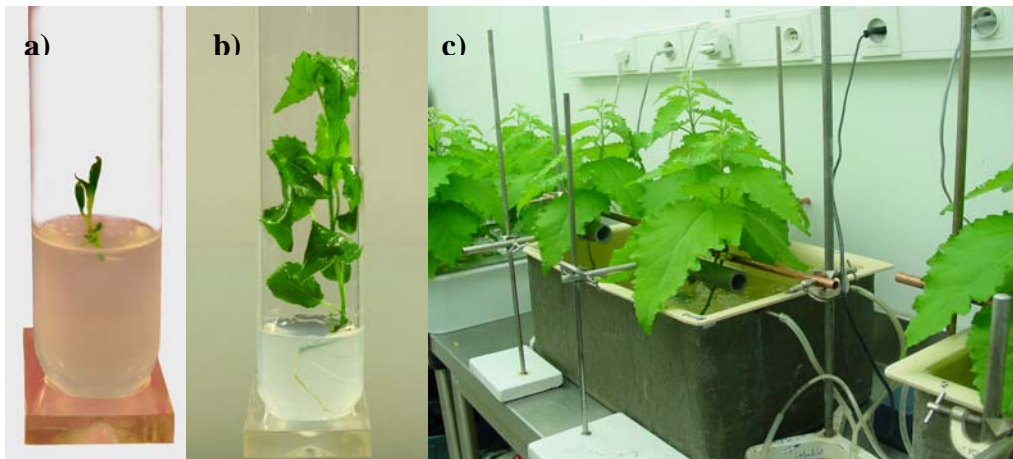


Figure 12 : Matériel végétal et conditions de culture. Les expériences sont réalisées sur des peupliers hybrides B117 de type sauvage (*Populus tremula* x *Populus alba*). Les plantes ont été régénérées par culture *in vitro* à partir d'axes de tiges (a) sur un milieu Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962). Lorsque les plants ont atteint une hauteur d'environ 4 cm (b), ils ont progressivement été acclimatés (Martin *et al.*, 2008) sur une solution hydroponique (c). Les expériences sont réalisées une fois que les peupliers ont atteint une taille de 30 à 40 cm.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Matériels et méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Les expériences sont réalisées sur des peupliers hybrides B117 de type sauvage (*Populus tremula x Populus alba*, clone INRA 717-1B4) âgés de 7 à 9 semaines. Les plantes ont été régénérées par culture *in vitro* à partir d'axes de tiges sur un milieu Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962). Lorsque les plants ont atteint une hauteur d'environ 4 cm, ils ont progressivement été acclimatés (Martin *et al.*, 2008) sur une solution hydroponique (Figure 12). Les peupliers sont ensuite cultivés en chambre climatisée à une température de 22°C pendant le jour et de 18°C pendant la nuit, avec un régime photopériodique de 16h de lumière pour 8h d'obscurité. Toutes les expériences sont faites sur des peupliers de 30 à 40 cm de hauteur. Quatre jours minimum avant chaque traitement, les plantes sont transférées dans un nouveau bac hydroponique, afin que le stress mécanique de l'installation n'influence pas l'expérience (Martin, 2009). Lors du transfert, chaque plante est fixée quelques centimètres au dessus du collet par un collier, la tige ayant été préalablement protégée par de la mousse. Les feuilles gênantes pour l'expérimentation situées sous le collier de fixation, sont éliminées à l'aide d'une lame de rasoir.

Traitements

La sollicitation mécanique est réalisée par une flexion en enroulant la partie basale de la tige autour d'un tube en PVC de diamètre défini. Connaissant le diamètre de la tige, on peut calculer la somme des déformations d'après l'équation

$$\text{Somme des déformations} = \pi/3 \times (r^3 \text{ tige} \times r \text{ tube}) / (r \text{ tige} + r \text{ tube})$$

Au cours de nos expériences, une somme des déformations de $13,4 \text{ mm}^3 \pm 4,89$ a été appliquée pendant environ 8 secondes. Coutand *et al.* (2000) ont montré qu'une telle somme de déformation entraînait un arrêt de croissance longitudinale chez la tomate.

Le traitement lésant est générée par une brûlure. A l'aide d'une flamme, toute la surface inférieure de la feuille la plus basale de la plante est chauffée jusqu'à flétrissement des tissus. La feuille brûlée est laissée en place tout au long de l'expérience.

Tous les traitements de stress ont été réalisés vers 10 heures le matin, la sensibilité au stress mécanique variant en fonction du rythme circadien (Garner, 1996).

Extraction d'ARN et dosage

Afin d'identifier des gènes marqueurs du transfert d'information à distance, les apex des plantes sont prélevés à différents temps après le stress et plongés dans l'azote liquide en vue d'une extraction d'ARN.

Les ARN sont extraits par une méthode CTAB (Chang *et al.*, 1993), à partir d'échantillons d'apex broyés dans l'azote liquide afin de bloquer toute dégradation biologique. L'addition de LiCl pour une concentration finale de 2,5M permet de précipiter spécifiquement les ARN et d'éliminer les molécules d'ADN de l'extrait. Les ARN sont ensuite purifiés par traitement DNase en présence de RNasines qui inhibent les RNases éventuelles (DNase RQ1, Promega). La purification des ARN au tampon SSTE conduit à l'élimination de ces enzymes par précipitation grâce à l'action du détergent SDS et à la concentration élevée en NaCl du tampon. Après séparation des phases, les ARN sont précipités à l'éthanol absolu et lavés avec de l'éthanol 70%. Les culots d'ARN sont repris dans de l'eau stérile et stockés à -80°C pour éviter toute dégradation.

Les acides nucléiques sont ensuite dosés au NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc) par spectrophotométrie par mesure de la densité optique à 260 nm. Des rapports de densité optique (D.O.) renseignent sur la qualité des acides nucléiques extraits. Ainsi le rapport 260/280 renseigne sur une contamination par des protéines (pic d'absorption des acides aminés aromatiques à 280 nm) ou par des sels. Le rapport 260/230 renseigne sur une contamination par des polysaccharides. Le dosage des acides nucléiques permet d'ajuster les concentrations en ARN de tous les échantillons. Les ARN sont dilués pour avoir une concentration finale de 0,5µg/µl. La qualité des ARN est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % à raison de 1µg d'ARN par échantillon déposé.

Transcription Reverse (RT)

La synthèse d'ADNc simple brin à partir des ARN extraits est réalisée à partir du Kit Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen). Les ARNm sont mis en présence d'oligodéoxythymines (oligo(dT)) qui jouent le rôle d'amorce en se fixant sur la queue polyA des ARNm, et de dNTP qui servent de substrats à la reverse transcriptase. L'augmentation de température à 65°C permet la dénaturation des ARNs. Ensuite, le refroidissement brutal à 4°C facilite l'hybridation des oligo(dT) sur les queues polyA. La RT est réalisée à 42°C, température optimale de l'enzyme, pendant 60 minutes. Le tampon de réaction contient du Tris-HCl pour tamponner le pH et des cofacteurs de l'enzyme. Le DTT est un antioxydant, et les RNases OUT sont des inhibiteurs de RNases. L'augmentation de température à 70°C

Tableau 3 : Amorces et conditions de PCR pour les gènes cibles *Pta-ZFP2*, *Pta-ACS6*, *Pta-TCH4*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH3*, *Pta-JAZ5* et les gènes de référence *Pta-EF1 α* , *Pta-UP1* et *Pta-UBC*. Chaque gène est amplifié par un couple d'amorces spécifique à une température d'hybridation (Tm). La taille de l'amplicat permet de vérifier la spécificité de l'amplification.

gènes	Tm (°C)	taille amplicat (pb)	Fonction	Séquences des amorces
<i>Pta-ZFP2</i>	61	287	facteur de transcription a doigt de zinc (zinc finger putative)	S -> CGT-GCG-AGT-AAG-AAA-CC
				AS -> CAC-AGA-ACT-CTC-TTG-CGT-CT
<i>Pta-ACS6</i>	56-60	454	ACC synthase (voie de biosynthèse de l'éthylène)	S -> ACT-ACA-GGA-AGA-TAT-TGA-ATG
				AS -> TGG-CTT-CGA-GCA-ATG-AAA-AGA
<i>Pta-TCH4</i>	58-62	283	xyloglucan endotransglycosylase	S -> GA-TGA-GAT-AGA-TTT-TGA-ATT-C
				AS -> ATC-AGC-ATT-CCA-TAG-ACT-CGA
<i>Pta-TCH2</i>	61	243	calmoduline like protein, protéine fixant le Ca ²⁺	S -> TGA-TCA-AGA-TGG-TGA-TGG-TAA-TG
				AS -> CGC-AAA-AAC-ATC-AAT-GGA-AA
<i>Pta-EF1α</i>	61	381	facteur d'élongation pendant la traduction	S -> GAC-AAC-TAG-GTA-CTA-CTG-CAC-TGT-C
				AS -> TTG-GTG-GAC-CTC-TCG-ATC-ATG
<i>Pta-TCH3</i>	60	189	calmoduline like protein, protéine fixant le Ca ²⁺	S -> ATG-GCT-TCA-TTT-CTG-CTG-CT
				AS -> CAT-TGG-TTT-TTG-GGT-TTT-GG
<i>Pta-JAZ5</i>	58	246	jasmonate zim domain protein 5	S -> TCT-TGC-TGC-AAC-CCT-TTC-TT
				AS -> GGT-AAG-GCC-GAG-GAG-ATC-AT
<i>Pta-UP1</i>	60	215	unknown protéine	S-> TCG-TCC-TGT-CAC-AGC-TCC-AAA
				AS-> CAT-GGT-CCT-GGC-GCA-GAT-GA
<i>Pta-UBC</i>	60	146	ubiquitine	S-> GGG-TCC-AGC-TTC-TTG-CAG-TC
				AS-> CCC-GGC-TCT-AAC-CAT-ATC-CA

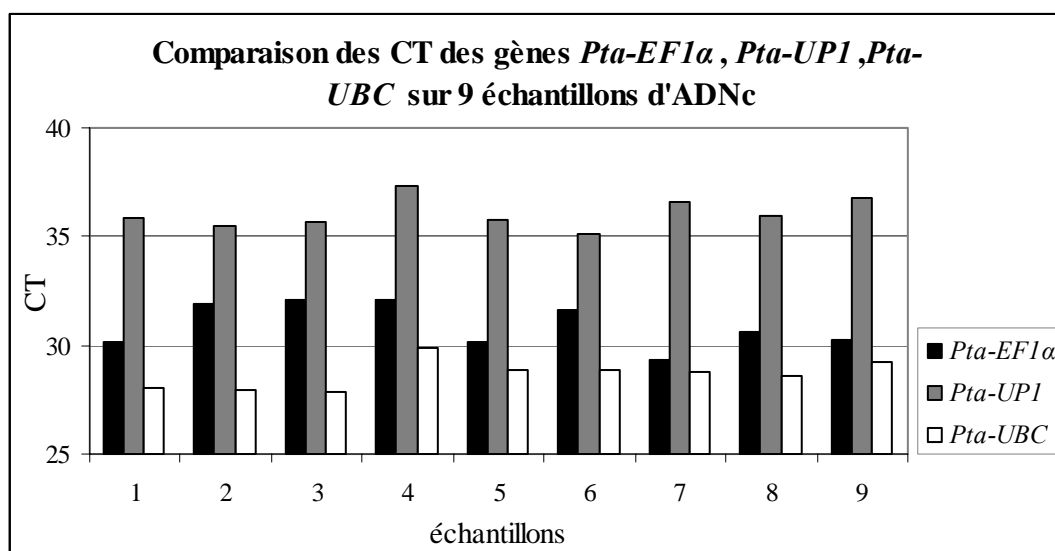


Figure 13 : Validation de *Pta-UBC* en tant que gène de référence pour l'évaluation de l'expression relative des gènes cibles par PCR semi quantitative. Après extraction, dosage des ARN puis synthèse des ADNc, les gènes sont amplifiés spécifiquement par PCR. Leur cycle seuil (CT, cycle threshold) d'amplification est comparé entre différents échantillons. Les variations de CT entre échantillons des gènes *Pta-UBC* et *Pta-UP1* sont similaires entre elles à la différence des variations de *Pta-EF1 α* . Le gène *Pta-UBC* est donc choisi en tant que gène de référence.

permet de stopper la réaction. Les échantillons d'ADNc rétrotranscrits sont ensuite stockés à -20°C et contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose.

Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) semi quantitative en temps réel

La PCR permet de copier une séquence cible de manière exponentielle par cycles de réplication successifs dans un thermocycleur, grâce à l'activité d'une ADN polymérase thermostable. Avec l'addition du fluorochrome intercalant SybrGreen (iCycler iQ™), la PCR dite en temps réel permet d'obtenir les courbes d'amplification par détection de fluorescence. En effet, un dispositif dans le thermocycleur permet de lire la fluorescence émanant des tubes lors de l'hybridation des copies sens et antisens du gène amplifié. Ainsi, la quantité de produit amplifié est enregistrée « en temps réel ».

Afin d'étudier l'expression des gènes *PtaZFP2*, *PtaTCH2*, *PtaTCH3*, *PtaTCH4*, *PtaACS6* et *PtaJAZ5* avant et après flexion ou brûlure, 4µl dilué au 1/20 des échantillons d'ADNc issu de RT sont amplifiés pour les gènes cibles à une température d'hybridation de 60°C à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 3). Tous les gènes cibles sont « mécanosensibles » et l'induction de leur expression après stimulation mécanique a été mise en évidence dans l'organe stressé chez le peuplier (Martin *et al.*, 2008). Le gène *PtaZFP2* code potentiellement pour un facteur de transcription à doigt de zinc. Les gènes *PtaTCH2* et *PtaTCH3* codent pour des calmodulines like, protéines à propriétés de fixation du Ca²⁺, *PtaTCH4* code pour une xyloglucane endotransglycosylase, enzyme de modification des parois. *PtaACS6* code pour une acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase, enzyme de biosynthèse de l'éthylène. *PtaJAZ5* code pour une jasmonate zim domain protein 5, gène sensible aux jasmonates. La spécificité de l'amplification des amorces peut être contrôlée pour chaque PCR par l'étude de la courbe de fusion (Annexe 1) ainsi que par la vérification de la taille du fragment amplifié par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

Le gène codant pour l'ubiquitine (*Pta-UBC*) est exprimé constitutivement et de manière constante, il représentera le gène de référence pour la PCR (Figure 13). Son rôle de gène de référence est validé par l'exploitation de deux autres gènes de ménage : *PtaEF1α* et *PtaUPI*. *PtaEF1α* ne présentait pas une expression constante dans le cas de la flexion et n'a donc pu être exploité en temps que gène de référence. Précédemment, ce gène avait été utilisé en tant que gène de référence dans les tiges stressées (Martin *et al.*, 2008). Une étude protéomique (Azri *et al.*, 2009) sur les réponses au gravitropisme chez le peuplier montre des variations de *PtaEF1α* au niveau protéique dans l'apex qui ne sont pas observables dans la tige. Ces résultats concordent avec les présentes observations et suggèrent que les variations

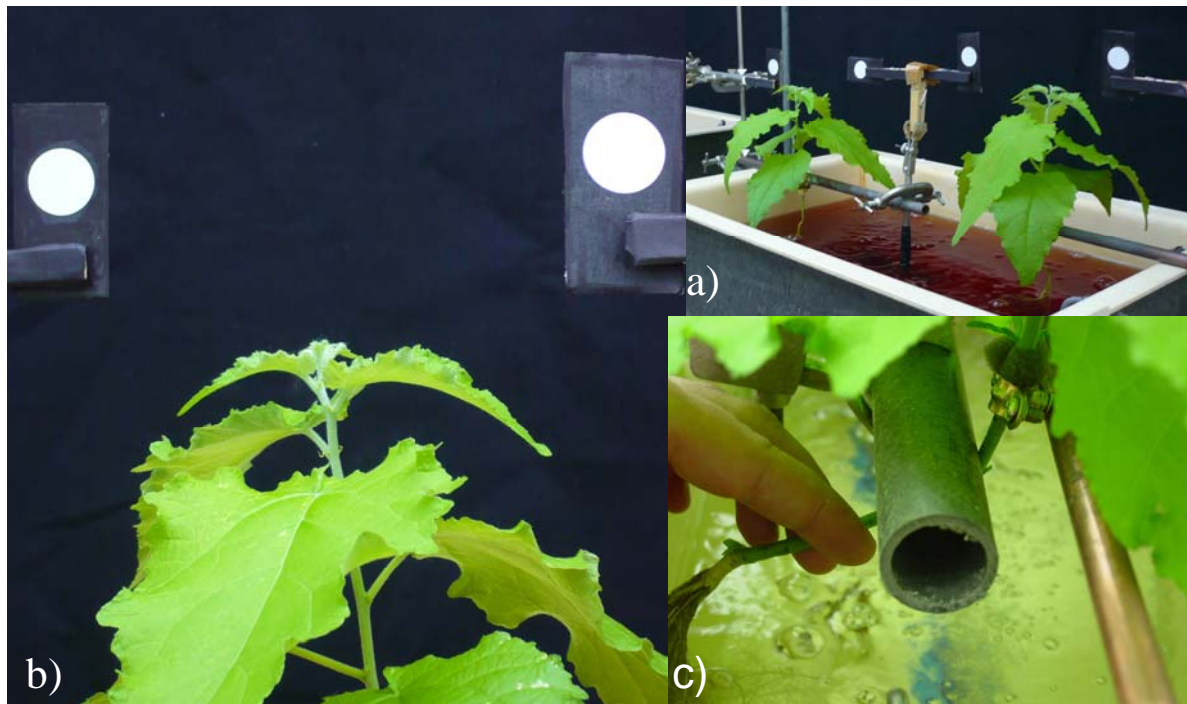


Figure 14 : Installation pour mesures de croissance par photographie et traitement de flexion. Les plantes sont installées et fixées au-dessus du collet en bac hydroponique (a). Les photos sont prises toutes les 15 minutes pendant 5 jours avec un fond noir et deux mires blanches de 20mm de diamètre (b). Elles représentent des échelles ainsi que des repères de position et sont disposées dans l'axe de la tige. Les traitements de flexions sont quantifiés par l'apport d'une somme des déformations contrôlée en fléchissant la base de la tige de diamètre connu sur un tube en PVC de diamètre connu (c).

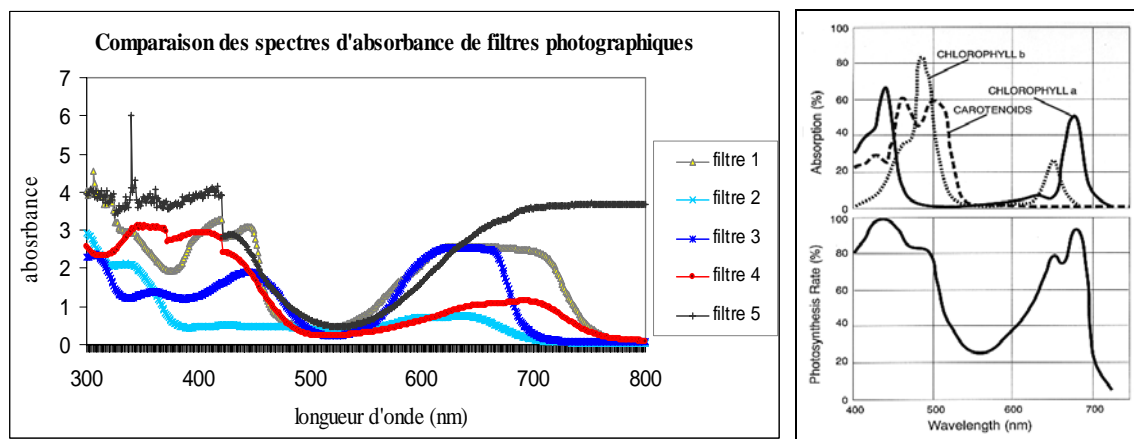


Figure 15 : Validation de l'utilisation du filtre 1 sur le flash des appareils photos pour les mesures de croissance. Pour limiter l'impact physiologique du flash sur les plantes un filtre vert est positionné sur le flash. Les spectres d'absorbance de différents filtres photographiques sont mesurés avec un spectrophotomètre. Le filtre 1 est sélectionné et transmet une lumière dont les longueurs d'onde ne sont pas absorbées par les pigments photorécepteurs de la plante.

de *PtaEF1α* sont déjà observables au niveau du transcriptôme. Ce gène serait donc un mauvais candidat de gène de référence dans le cas de réponse au stress mécanique au niveau de l'apex. Ainsi, la quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt (QR) sera exprimée en comparaison du gène de référence *Pta-UBC* selon la formule proposée par Pfaffl (2001).

$$QR = 2^{\Delta Ct \text{ gène cible}} / 2^{\Delta Ct \text{ gène de référence}}$$

Mesures de croissance longitudinale et prise d'image

La croissance est mesurée un jour avant l'application du stress et pendant 3 jours après (de J-1 à J+3). Dans une première expérience, les plantes ont été mesurées manuellement à l'aide d'un mètre rigide, tous les jours, à heure fixe. Les données présentées correspondent à 3 répétitions biologiques sur 20 plantes dont 6 plantes témoins, 7 plantes brûlées et 7 plantes fléchies. La différence de taille entre deux jours permet d'estimer la croissance journalière. Dans un second cas, la croissance a été quantifiée par mesure photographique (Figure 14). Les données de croissances mesurées par photographie présentées correspondent à 3 répétitions biologiques de 9 plantes dont 3 témoins, 3 brûlées et 3 fléchies.

Des photographies ont été prises à intervalle régulier (15 minutes) durant 5 jours à l'aide d'un programmateur. Afin de limiter l'impact d'un flash lumineux sur la croissance durant la nuit, et de biaiser ainsi la mesure, des filtres verts ont été installés sur les flashes des appareils. La lumière verte présente des longueurs d'ondes non perçues par la plante (Richter *et al.*, 1994). Les spectres d'absorption de différents filtres ont ainsi été testés afin de ne transmettre qu'une lumière non absorbée par la plante (Figure 15). Le flash est ainsi appliqué de jour comme de nuit afin d'éviter de faire bouger l'appareil photo pendant l'expérience. Ensuite, pour obtenir une bonne qualité d'image et limiter la saturation de lumière en condition de jour, le temps d'obturation de l'appareil est diminué. Ces réglages de prise d'image permettent d'obtenir des qualités de photos comparables pour deux conditions d'éclairage différentes et d'automatiser la prise d'images. Des mires circulaires blanches de 20mm de diamètre ont été installées près des plantes. Elles ont pour fonction de rendre compte des déplacements possibles de l'appareil photo lors de l'expérience (Figure 16). De plus, elles ont un rôle de mire de dimension pour les calibrations pixel-mm. Les mires sont disposées dans l'axe de la plante afin de constituer une échelle de taille la plus fiable possible. Une mire ne peut seulement rendre compte que de mouvements de translation, c'est pourquoi l'ajout d'une deuxième mire permet de rendre compte d'éventuel mouvement de rotation de

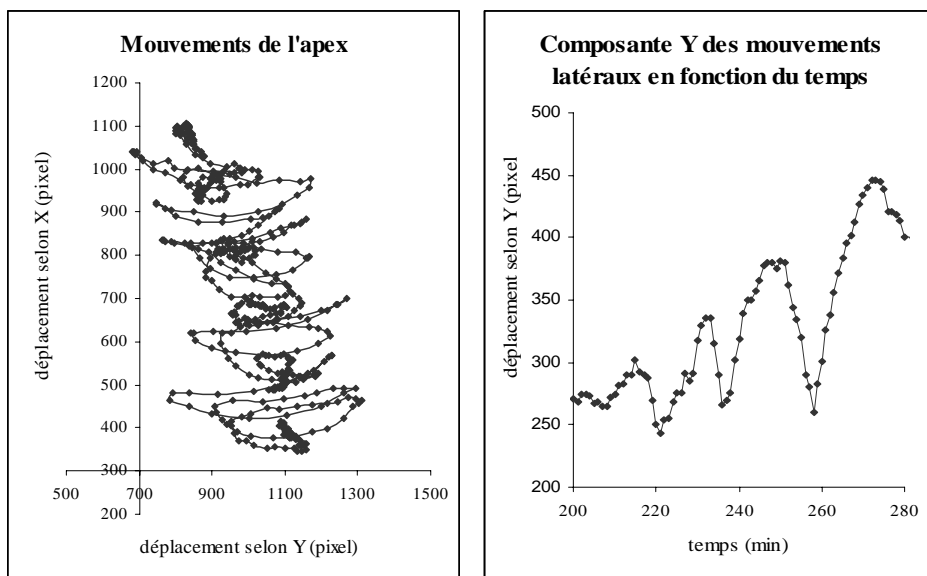


Figure 16 : mouvements de circumnutation de la tige selon l'axe X et Y exprimés en pixel par minute. Les mouvements ont été enregistrés par des prises de vues réalisées toutes les 15 minutes. Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ. Le déplacement de l'apex est suivi. Tout mouvement de la mire est soustrait au déplacement de l'apex. Les mouvements seront ensuite exprimés en mm d'après l'échelle.

l'appareil photo sur son pied. Toutes ces mesures de prise d'image permettent d'augmenter la précision de mesure photographique de croissance.

Traitement et analyse d'image

Les images sont analysées avec le logiciel ImageJ. La position de l'apex est déterminée pour chaque photo. L'analyse de toutes les images permet ainsi de déterminer le déplacement de l'apex en fonction du temps. Le choix d'un point à suivre est important dans la mesure où il doit être représentatif de la croissance de l'apex, être visible et lié à l'apex durant toute la durée de l'expérience. Ensuite, le déplacement de la mire est soustrait au mouvement de la plante. Le contraste de la mire sur fond noir permet d'automatiser l'analyse du déplacement de la mire. De plus, la croissance du peuplier est marquée par des mouvements hélicoïdaux de circumnutations (Figure 16). Ces mouvements rendent impossibles la mesure de croissance longitudinale par capteur de déplacement chez le peuplier. Ces mouvements de circumnutations dans l'axe X biaisent l'information perçue concernant la croissance en Y, conduisant à l'observation de croissance instantanée négative. Ainsi, avant de définir des réponses de croissance, il est essentiel de caractériser la croissance du peuplier.

Traitements statistiques des données

Les données de croissance et d'expression relative de gènes sont traitées statistiquement à l'aide du logiciel R. Des analyses de variance paramétrique (ANOVA) ont été réalisées dans la limite de leurs conditions d'application. Ensuite les différences entre groupes ont été identifiées par le test post-hoc ANOVA de Tukey et les groupes significativement différents sont identifiés par des lettres différentes. Si les conditions n'étaient pas remplies, un test équivalent non paramétrique a été préféré (Kruskal et Wallis).

Dans le cas de l'analyse de variance des quantités relatives de transcripts (QR), les QR ont été traitées statistiquement après transformation logarithmique. Cette transformation permet d'égaliser les variances et de remplir ainsi les conditions d'homoscédasticité de l'ANOVA. Elle s'explique d'une part du fait que la réaction PCR amplifie la variabilité des QR de manière exponentielle et d'autre part, car cette variabilité est encore augmentée par la méthode de calcul des QR (Pfaffl, 2001). Enfin, les hypothèses H0 ont été rejetées pour un seuil de signification de 5%.

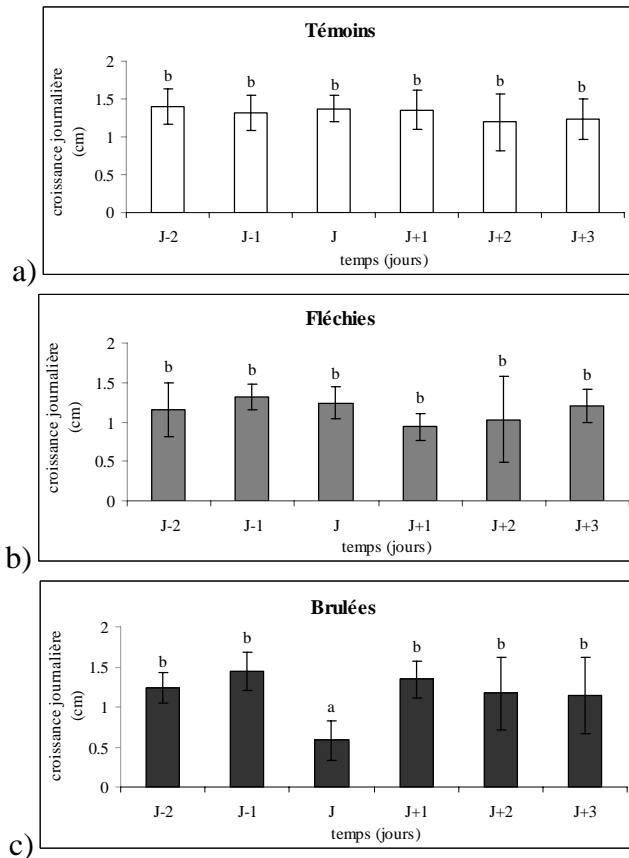


Figure 17 : Evolution des croissances journalières de plantes témoins (a), fléchies (b) ou brûlées (c) mesurées manuellement. Les plantes sont cultivées sur solution hydroponique et mesurent entre 30 et 40 cm de hauteur. La croissance d'un jour est mesurée le lendemain matin et les plantes sont stressées le jour J. Les résultats représentent 3 répétitions de 20 plantes. Les flexions ont été réalisées sur des tubes de 40mm soit pour une somme des déformations de 13,4 mm³ en moyenne. Les brûlures ont été réalisées sur la feuille la plus basale de la plante. Les résultats ont été traités statistiquement par test de Kruskal et Wallis, pour un seuil de signification de 5%.

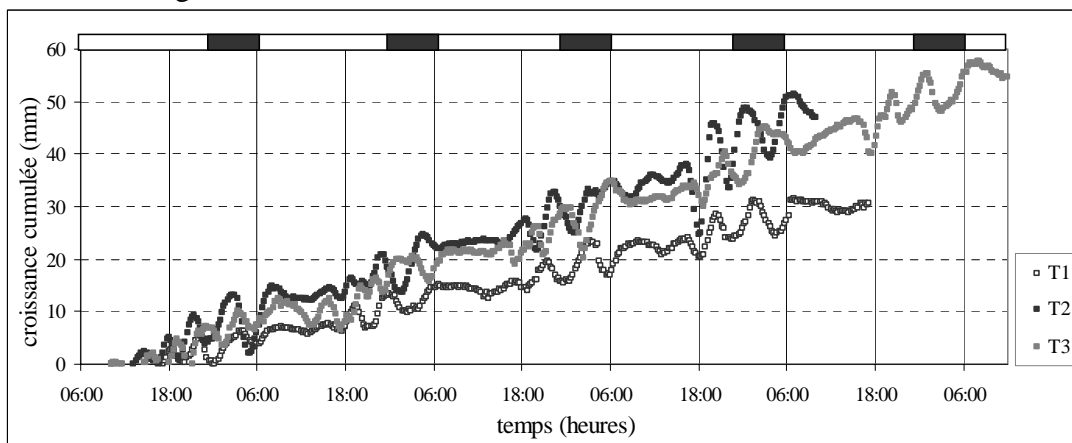


Figure 18 : Comparaison des croissances cumulées de trois plantes témoins et mise en évidence d'un rythme de la croissance du peuplier. Les plantes ont été photographiées toutes les 15 minutes pendant 4 jours puis le déplacement de l'apex a été mesuré avec le logiciel Image J. Les mouvements de l'appareil ont été soustraits aux mouvements de la plante puis la croissance cumulée de chaque plante a été calculée en mm à l'aide d'une échelle. Un rythme d'environ 12 heures de période est observable.

Résultats

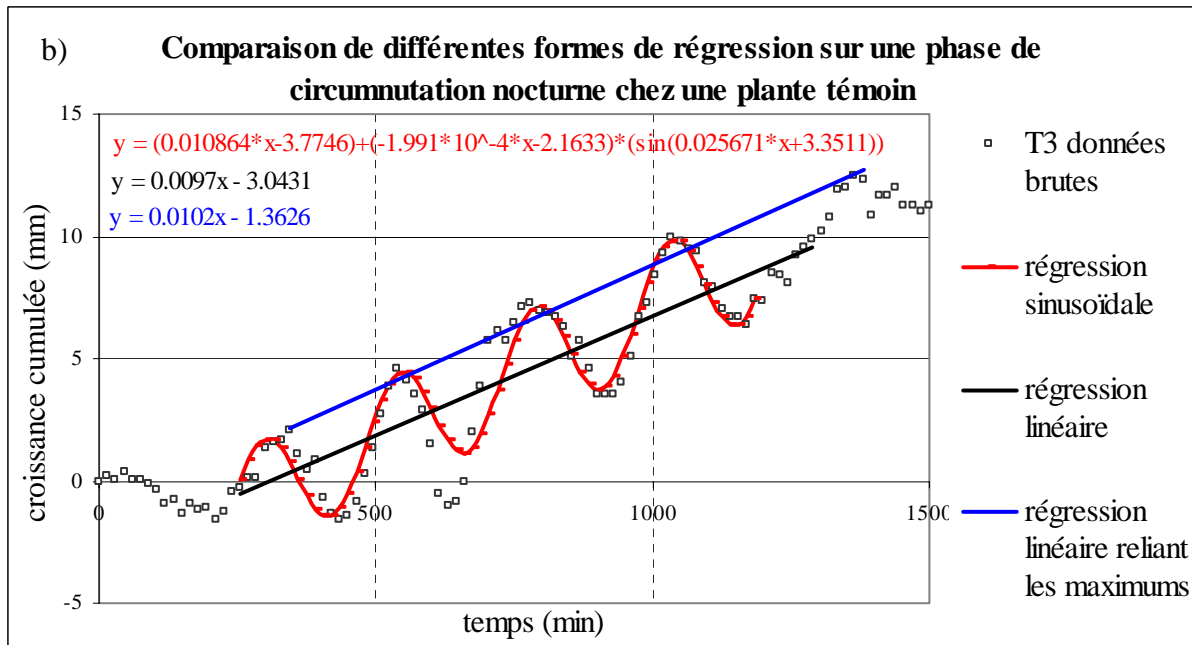
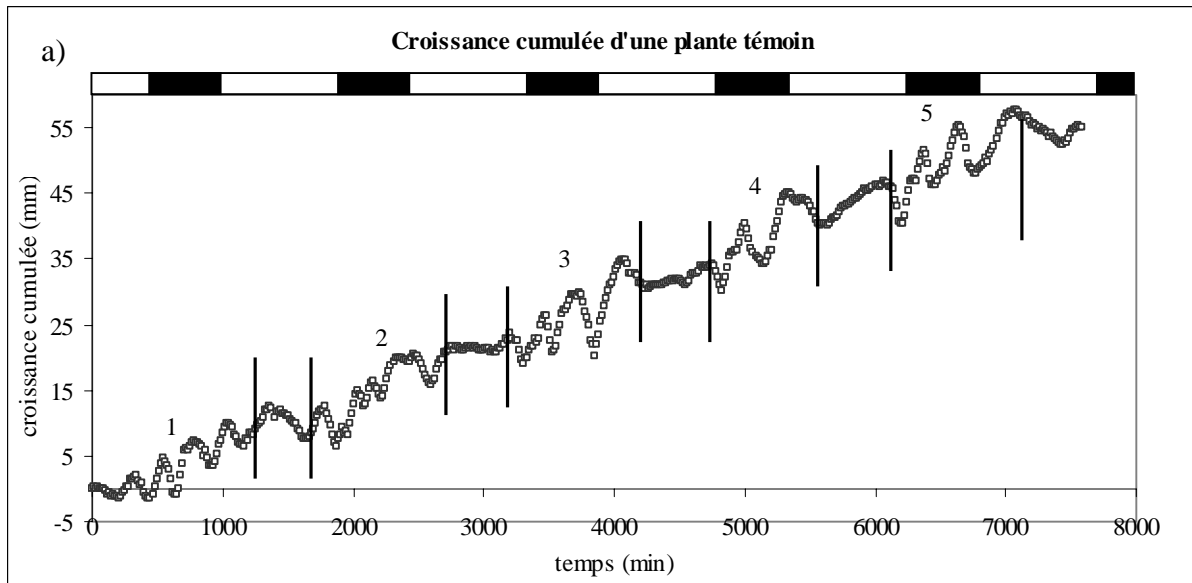
Effet d'un stress sur la croissance journalière du peuplier mesurée manuellement

Les mesures manuelles des croissances journalières de plantes témoins, fléchies et brûlées (Figure 17) montrent que la croissance du peuplier est en moyenne de 1,2 cm par jour, et qu'elle est relativement stable au cours des 6 jours d'expérience chez le témoin (Figure 17a). La croissance des plantes brûlées au jour J (Figure 17c) est significativement différente des autres jours et autres traitements. Les résultats montrent que le traitement de brûlure diminue de manière significative la croissance du jour J, jusqu'à 0.5cm par jour. La flexion ne diminue pas la croissance de manière significative le jour de la sollicitation (Figure 17b) mais une légère diminution de croissance (1cm par jour) est observable le lendemain de la flexion (J+1).

Modéliser et traiter les courbes de croissances cumulées mesurées par photographie

Afin de mettre en évidence des réponses de croissance longitudinale à des sollicitations mécaniques il est tout d'abord nécessaire de caractériser la croissance du peuplier. En effet, les croissances cumulées mesurées par photographie prises toutes les 15 minutes présentent un signal brut qui nécessite un traitement. La position de l'apex est préalablement mise à l'échelle et exprimée en mm, puis le signal est traité en croissance cumulée, sa position en Y étant égale à 0 au temps T0.

La croissance cumulée du peuplier présente un rythme (Figure 18) en relation avec la photopériode. Le milieu de la journée (de 6 heures à 18 heures) est caractérisé par une phase d'arrêt ou de ralentissement de croissance qui sera appelée « phase d'arrêt de croissance diurne » dans la suite de ce rapport. Cette phase correspond à la période du cycle nyctéméral durant laquelle le potentiel hydrique de la plante est le plus faible du fait d'une évapotranspiration maximale (Awad, 2010). Ensuite, entre 18 heures et 6 heures, le déplacement de l'apex est caractérisé par des phases de circumnutations ainsi qu'une croissance très active. A ce moment du cycle, la plante est au potentiel hydrique d'équilibre et l'élongation des tissus est ainsi favorisée (Awad, 2010). Pour mettre en évidence des réponses de croissance, nous nous proposons de caractériser la croissance par des paramètres de régression linéaire et de la modéliser (Figure 19). Le rythme de croissance du peuplier nécessite de régresser les courbes de croissance cumulée par morceau, ou de manière segmentée. Si les phases d'arrêt de croissance diurne présentent une tendance linéaire, les phases de circumnutations nocturnes présentent une forme sinusoïdale. La pente de ces courbes représente la vitesse de croissance, et il est important d'évaluer et de valider la



Jour	phase de circumnutation	pente de régression sinusoïdale (mm/min)	pente de régression linéaire (mm/min)	pente de régression linéaire reliant les maximums (mm/min)
J-1	1	0.0108	0.0098	0.0107
J	2	0.012	0.012	0.0124
J+1	3	0.008	0.0114	0.0128
J+2	4	0.009	0.0124	0.0156
J+3	5	0.01	0.0123	0.0114

Figure 19 : Segmentation de la croissance du peuplier selon la photopériode et validation de la régression linéaire des phases de circumnutations. La croissance cumulée en mm d'une plante témoin (a) est exprimée en fonction du temps (min). La photopériode est représentée par des barres noires et blanches. La segmentation des phases de croissance est représentée par des lignes verticales et délimite des phases d'arrêt de croissance diurnes ainsi que des phases de circumnutation numérotées de 1 à 5. (b) Différents types de régression pour la phase de circumnutation 1. **Tableau :** Comparaison des vitesses de croissance calculées selon les différents types de régression pour les 5 phases de circumnutation.

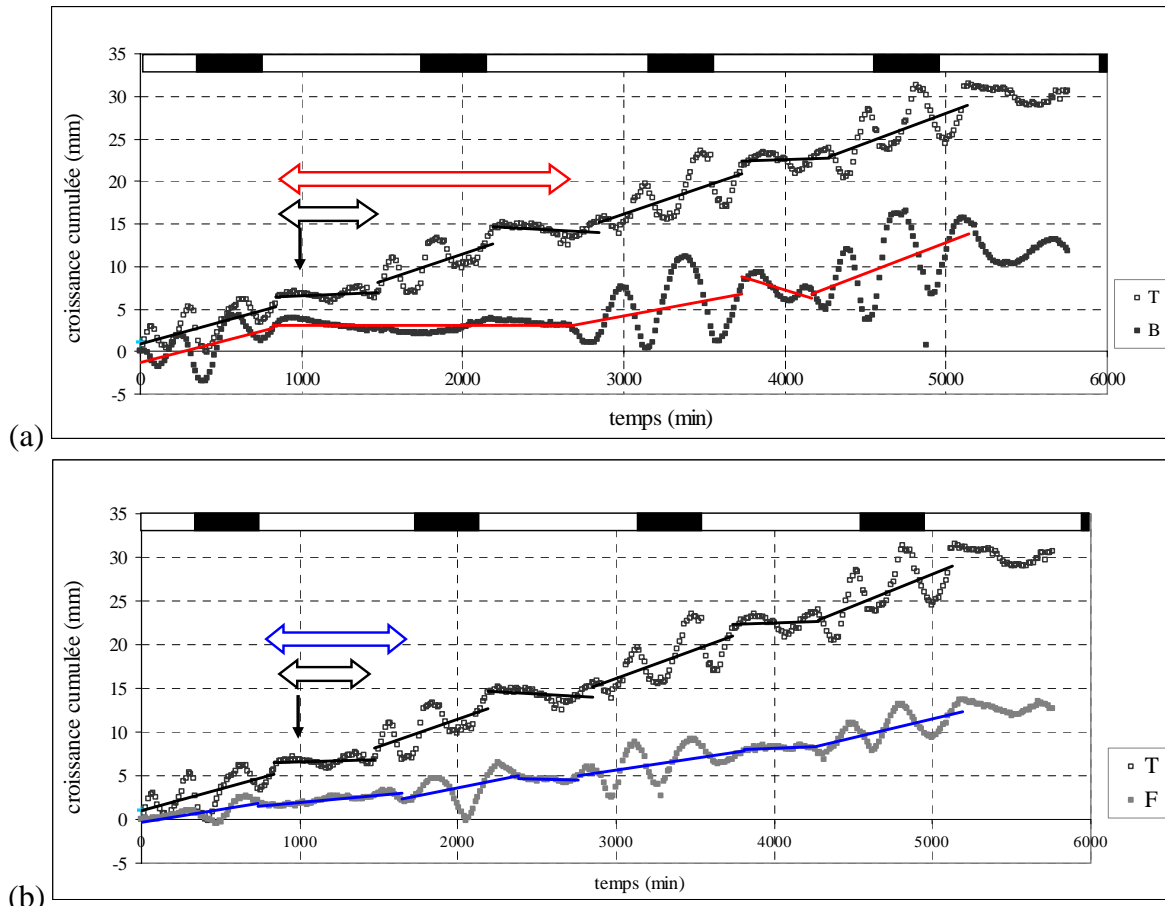


Figure 20 : Effet d'une brûlure (a) ou d'une flexion (b) sur la croissance : allongement de l'arrêt de croissance diurne le jour du traitement. La croissance cumulée en mm est exprimée en fonction du temps (min). La photopériode est représentée par des barres noires et blanches. Les régressions linéaires segmentées sont représentées sur le graphique en noir pour les témoins (T), rouge pour le brûlé (B) et bleu pour le fléchi (F). Le stress est appliqué au bout de 1000 minutes et est représenté par une flèche verticale. Les doubles flèches horizontales représentent la durée de l'arrêt de croissance diurne le jour du traitement.

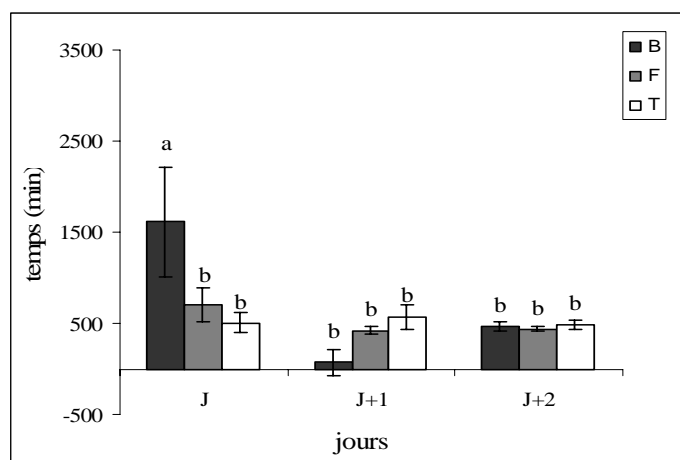


Figure 21 : Comparaison de la durée de l'arrêt de croissance diurne en minutes entre plantes témoins (T), fléchies (F) et brulées (B). Les plantes sont stressées le jour J. La durée de l'arrêt de croissance des plantes brulées le jour du stress est significativement différente de celles des autres jours et des autres traitements. La faible durée de l'arrêt de croissance des plantes brulées le lendemain du stress s'explique par la réminiscence de l'arrêt du jour précédent. Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques. Les données sont traitées statistiquement par ANOVA 2 pour un seuil de signification de 5%.

possibilité de régression linéaire sur les phases de circumnutations nocturnes. La figure 19b présente les pentes obtenues par 3 types de régression : une régression linéaire simple, une régression linéaire reliant les maximums de la courbe sinusoïdale et enfin une régression sinusoïdale d'équation : $y = (ax + b) + (cx + d)(\sin(ex + f))$. Le tableau présenté en figure 19c décrit les pentes obtenues pour les trois types de régression sur les 5 phases de circumnutations nocturnes de la croissance cumulée présentée dans la figure 19a. Il est intéressant de noter que les pentes sont très semblables entre les différents types de régression et qu'ainsi l'hypothèse de régression linéaire segmentée peut être validée en tant que modèle de croissance du peuplier. Les courbes de croissance cumulées sont alors caractérisées par des successions de segments de longueurs qui correspondent à des durées (en min) et de pentes qui correspondent à des vitesses (en mm/min) spécifiques.

Effet des traitements sur les durées des phases d'arrêt de croissance diurnes

La première composante de réponse de croissance observable semble être un allongement de la phase d'arrêt de croissance diurne le jour du traitement (Figure 20). Alors que les plantes témoins reprennent une croissance normale avec phase de circumnutations, les plantes stressées présentent un arrêt de croissance plus long. On peut noter que cet arrêt de croissance ne perturbe pas le rythme des phases de la plante mais qu'en revanche il en résulte une croissance cumulée plus faible que chez les peupliers non stressés. De plus, on peut observer que l'arrêt de croissance de la plante brûlée (Figure 20a) est beaucoup plus long que celui de la plante fléchée (Figure 20b) et se cumule à celui de la journée suivante, « supprimant » ainsi une phase de croissance active.

La figure 21 présente la comparaison des durées d'arrêt de croissance diurne des plantes témoins, fléchées et brûlées du jour du stress jusqu'au surlendemain. Les durées sont exprimées en minutes et les valeurs observées représentent la moyenne de trois répétitions biologiques. Le traitement statistique des données, par analyse de variance à deux facteurs, montre que, le jour du traitement, la durée de l'arrêt de croissance diurne de la plante brûlée est significativement différente de la durée des arrêts de croissance des autres jours et autres traitements pour un seuil de signification de 5%. De plus, la faible durée de l'arrêt de croissance des plantes brûlées le lendemain du stress s'explique par la réminiscence de l'arrêt de croissance du jour précédent. Néanmoins, la figure 21 ne présente pas d'effet significatif de la flexion sur la durée de l'arrêt de croissance diurne. Cette durée est légèrement plus grande mais ne peut être discriminée.

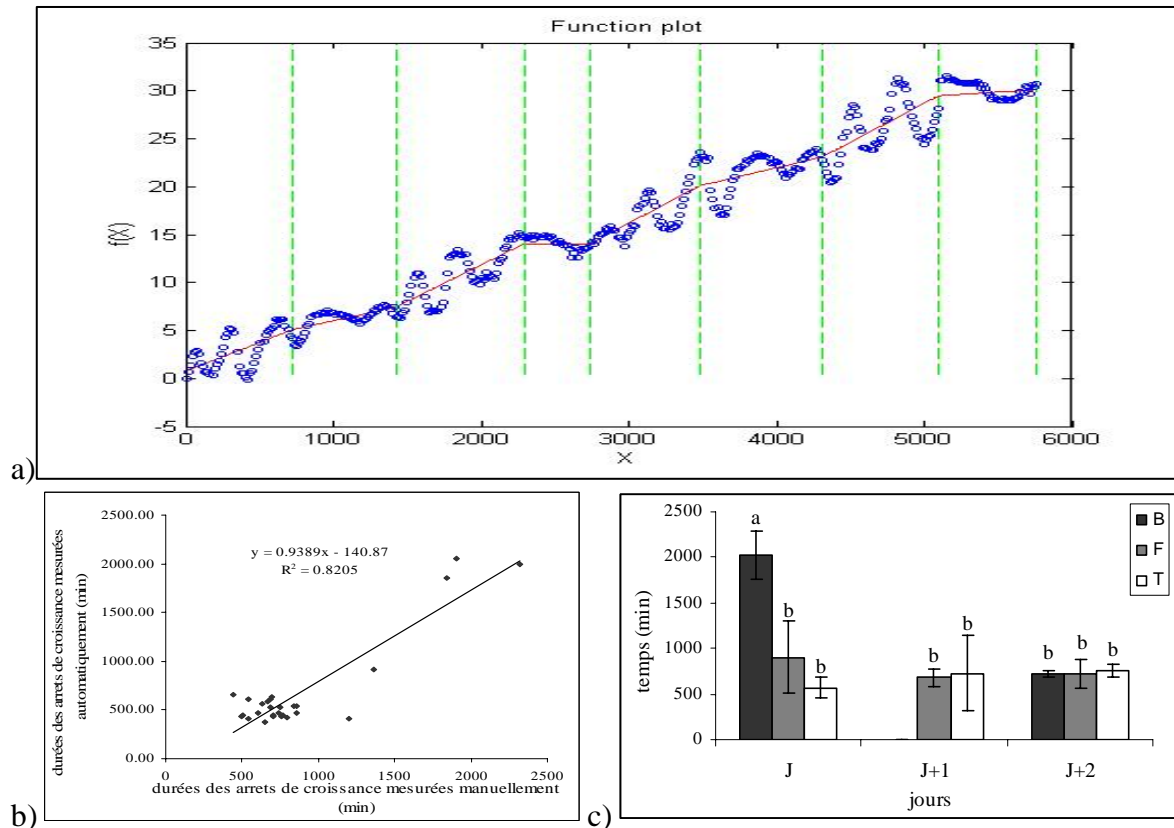


Figure 22 : Modèle de régression linéaire segmentée automatisé de la croissance cumulée. (a) exemple de courbe de croissance cumulée témoin traité par le modèle de régression linéaire segmentée automatisé sur Matlab. Le degré de liberté que sont les bornes permettent de minimiser la somme des carrés des écarts. (b) Comparaison de la méthode automatique avec la méthode manuelle sur la durée des arrêts de croissance. ($R^2= 0.8205$). (c) Comparaison de la durée de l'arrêt de croissance diurne en minutes entre plantes témoins (T), fléchies (F) et brulées (B) mesurée par le modèle de régression automatisé. Les résultats représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques traitées statistiquement par ANOVA 2 pour un seuil de signification de 5%.

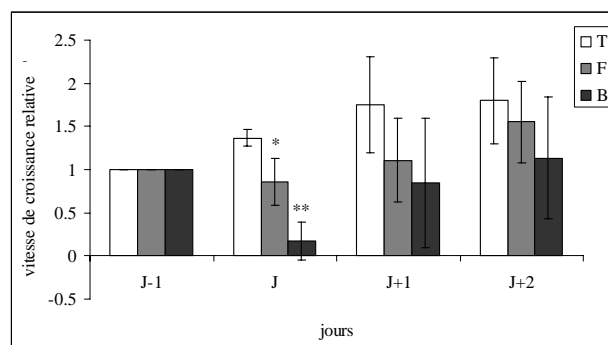


Figure 23 : Comparaison des vitesses de croissance relative nocturne entre plantes témoins (T), fléchies (F) et brulées (B). La vitesse de croissance est normalisée par rapport à la vitesse de croissance de la plante durant la scotophase (phase obscure) du jour $j-1$. Les résultats présentent les moyennes de 3 répétitions biologiques traitées statistiquement par ANOVA. La vitesse de croissance des plantes fléchies et brulées est diminuée la nuit suivant le traitement pour un niveau de signification de 0.053 chez les plantes fléchies et de 0.001 chez les plantes brulées.

Automatisation du traitement des courbes de croissance cumulées

Pour approfondir l'étude de l'effet d'une flexion sur la croissance longitudinale, il peut être intéressant de multiplier les répétitions biologiques. La régression par morceau doit alors être automatisée afin de limiter tout effet lié à l'expérimentateur. Un algorithme de régression linéaire segmentée a donc été mis en place sur Matlab (Figure 22a). Il détermine les bornes et pentes de chaque segment de la courbe de croissance cumulée. La position des bornes des segments se détermine en minimisant la somme des carrés des écarts après plusieurs itérations. De plus, des bornes maximum et minimum ont été imposées pour les pentes, afin d'interdire des croissances négatives par exemple. Une comparaison des segmentations manuelles et automatiques pour une même courbe est présentée en annexe. L'automatisation du traitement des courbes de croissance est confrontée à la méthode de traitement manuelle. Il existe une bonne corrélation entre des valeurs de durée des arrêts de croissance diurne mesuré par les automatiquement et manuellement (Figure 22b). Un test de Student pour données appariées valide cette corrélation. Enfin, l'analyse de variance à deux facteurs sur les durées d'arrêt de croissance diurnes mesurées automatiquement donne les mêmes résultats que celle réalisée sur les mesures manuelles (Figure 22c).

Effet des traitements sur les vitesses de croissance nocturnes

L'automatisation du traitement de régression linéaire par morceau peut être réalisée en fixant les bornes. Le rythme des plantes étant dépendant de la photopériode, les croissances cumulées sont découpées selon le rythme circadien de la chambre de culture et des régressions linéaires sont réalisées selon ces bornes. Cette segmentation imposée permet d'étudier une autre composante de la réponse de croissance : la vitesse de croissance. Les scotophases (phases nocturnes du cycle nyctéméral) présentent les plus fortes croissances, et sont donc comparées entre traitement avant et après le stress. La vitesse de croissance étant fortement dépendante de l'âge de la plante, les vitesses de croissance sont normalisées par rapport à la vitesse de croissance de la plante la nuit précédant le stress (J-1) (Figure 23). Les plantes témoins présentent ainsi une augmentation de la vitesse de croissance relative nocturne quasi-linéaire. La taille des écart-types traduit la forte variabilité inter échantillons liée à l'âge de la plante. En revanche, les plantes stressées présentent une diminution de la vitesse de croissance relative la nuit suivant le stress. La brûlure présente un effet plus important sur la vitesse de croissance relative que la flexion. La nuit suivant le stress (J), on peut mettre en évidence un effet de la flexion sur la vitesse de croissance relative nocturne pour un niveau de signification de 0.053. Cet effet de la flexion serait rejeté pour le seuil de

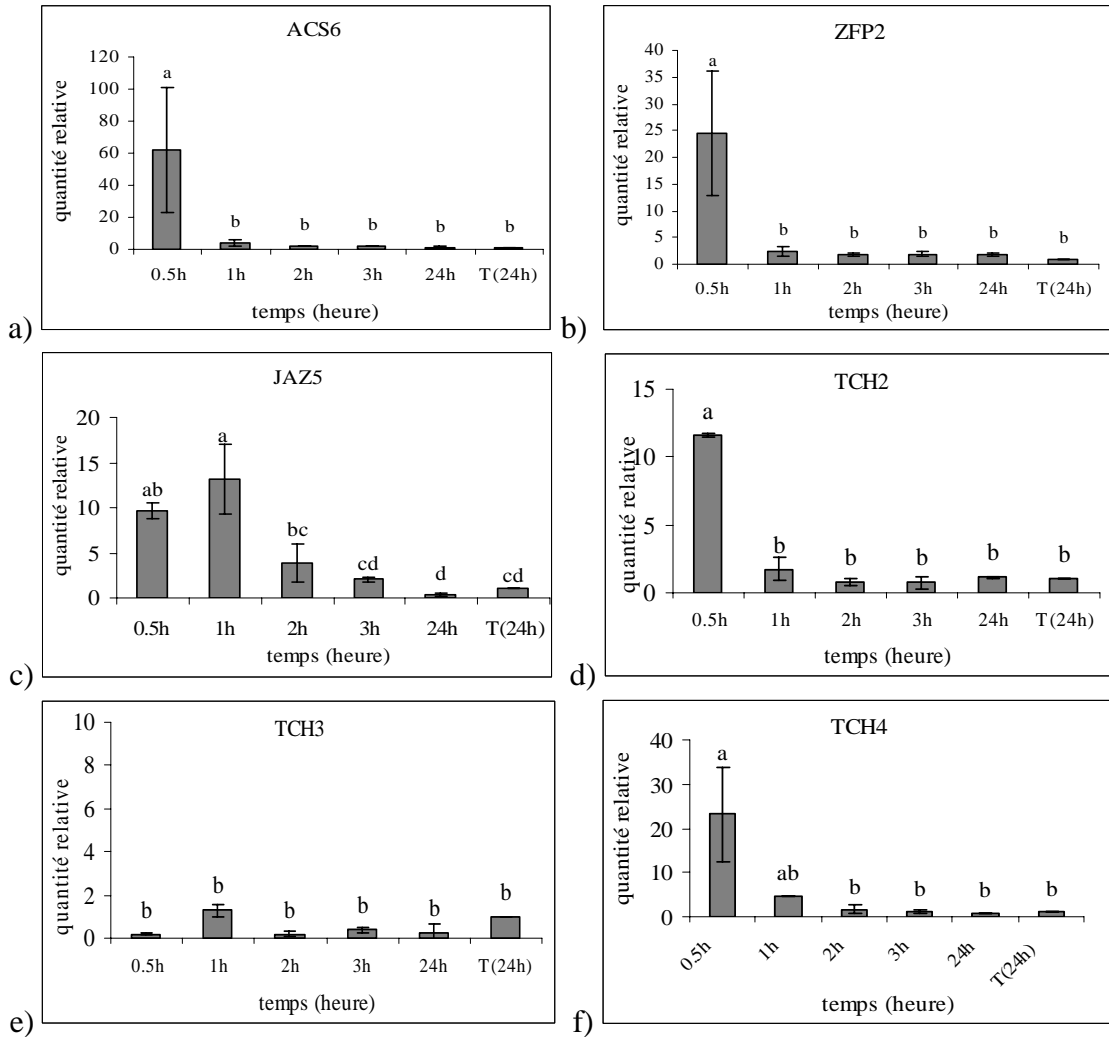


Figure 24 : Cinétique d'expression relative de gènes mécanosensibles dans l'apex après brûlure d'une feuille basale. L'expression des gènes *Pta-ZFP2* (a), *Pta-ACS6* (b), *Pta-JAZ5* (c), *Pta-TCH2* (d), *Pta-TCH3* (e) et *Pta-TCH4* (f) est étudiée à différents temps après une brûlure par rapport au gène de référence *Pta-UBC* par PCR semi quantitative en temps réel. Les résultats présentent les moyennes de 6 répétitions techniques. Les logarithmes des quantités relatives sont traités statistiquement par ANOVA pour un seuil de signification de 5%.

signification de 0.05 alors que l'effet de la brûlure est significatif pour un seuil de signification de 0.01.

Cinétiques d'expression de gènes mécanosensibles au niveau de l'apex après brûlure ou flexion de la tige.

Afin de comprendre les mécanismes de réponses de croissance longitudinale, l'expression de divers gènes mécanosensibles a été étudiée au niveau de l'apex après brûlure ou flexion dans la partie basale. Les résultats de PCR semi quantitative en temps réel sont normalisés par rapport au gène de référence *Pta-UBC* en condition témoin. Deux répétitions biologiques ont été réalisées pour les cinétiques d'expression après flexion et une répétition biologique a été réalisée pour les cinétiques d'expression après brûlure. Chaque répétition biologique comprend un minimum de 3 répétitions techniques. Les logarithmes des quantités relatives sont traités statistiquement par analyse de variance (ANOVA 1) pour un seuil de signification de 5%. L'expression des gènes cibles est étudiée sur une large échelle de temps : de 30 minutes jusqu'à 24H après le stress.

Les résultats de cinétique d'expression après brûlure (Figure 24) montrent que les gènes mécanosensibles *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH4* sont induits dès 30 minutes dans l'apex (Figure 24a, b, d et f) et que le gène *Pta-JAZ5* présente une accumulation de transcripts une heure après la brûlure (Figure 24c). Ces résultats sont à modérer du fait qu'une seule répétition biologique a été réalisée et nécessitent d'être validés par d'autres répétitions biologiques. Le gène *Pta-TCH3* ne présente quasiment pas de variation d'expression ou cours de la cinétique (Figure 24e).

Les résultats de cinétique d'expression après flexion (Figure 25) ne montrent pas d'induction des gènes mécanosensibles étudiés. Une légère augmentation du taux de transcripts des gènes *Pta-ZFP2* et *Pta-TCH4* est observable 2 heures après flexion (Figure 26b et f). Cette augmentation n'est pas significative et a été observée seulement sur l'une des deux répétitions biologiques.

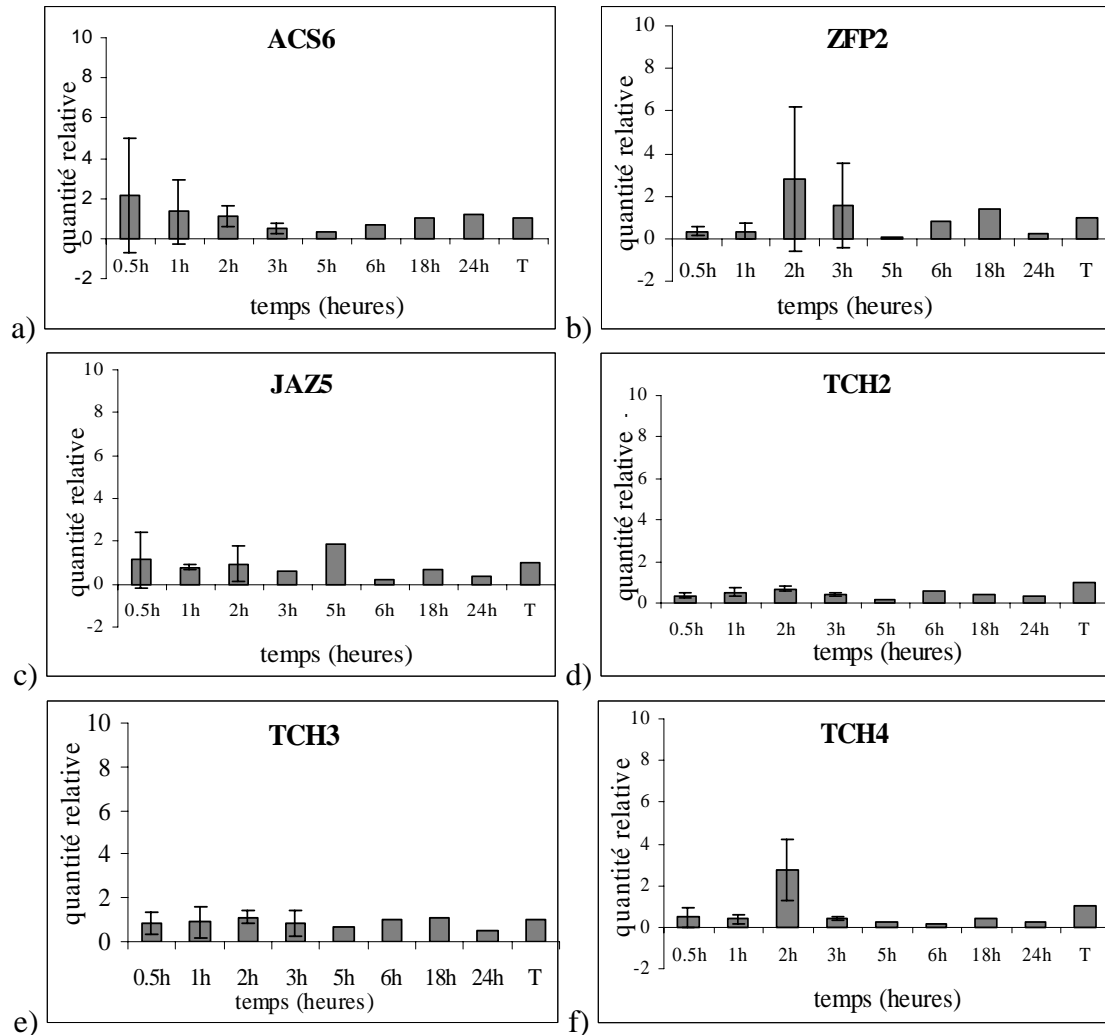


Figure 25 : Cinétique d'expression relative de gènes mécanosensibles dans l'apex après flexion de la tige en région basale. L'expression des gènes *Pta-ZFP2* (a), *Pta-ACS6* (b), *Pta-JAZ5* (c), *Pta-TCH2* (d), *Pta-TCH3* (e) et *Pta-TCH4* (f) est étudiée à différents temps après une flexion par rapport au gène de référence *Pta-UBC* par PCR semi quantitative en temps réel. Les résultats présentent les moyennes de deux répétitions biologiques avec 3 répétitions techniques. Les logarithmes des quantités relatives sont traités statistiquement par analyse de variance (ANOVA1) pour un seuil de signification de 5%.

DISCUSSION

La thigmomorphogénèse est généralement définie par deux grandes réponses physiologiques : une augmentation de la croissance radiale et une diminution de la croissance longitudinale. Bien que mises en évidence chez de nombreuses espèces, le phénomène n'est pas systématique (Coutand, 2009) et doit être caractérisé pour tout modèle étudié. Les recherches de l'équipe MECA ont mis en évidence des réponses de croissance radiale à la flexion chez le peuplier. Notre étude vise à identifier les réponses thigmomorphogénétiques de croissance longitudinale et à comprendre le transfert d'information entre la zone fléchie et l'apex, organe de contrôle de la croissance indéterminée. La littérature distingue deux types de stress mécaniques, les stress lésons et non lésons. De part leur nature, le transfert d'information peut être complètement différent. C'est pourquoi nous avons choisi de comparer les réponses à des flexions à celles aux brûlures.

Mettre en évidence et caractériser une réponse de croissance longitudinale à la flexion

Les études de croissance journalière mesurée manuellement permettent d'identifier un effet significatif de la brûlure sur la croissance longitudinale, de 1,2cm/jour en condition témoin, diminuant jusqu'à 0.5cm/jour après brûlure. Néanmoins, ces études n'ont pas permis d'identifier un effet significatif de la flexion sur la croissance journalière. Toutefois, il est intéressant de noter que la croissance des plantes fléchies semble être diminuée le lendemain du traitement de flexion. Tout d'abord la diminution de croissance pourrait n'être détectable que le lendemain. Ensuite, le fait de manipuler les plantes pour mesurer la croissance pourrait biaiser les résultats en induisant une acclimatation des plantes via une désensibilisation au toucher (Martin *et al.*, 2009). Ce type de mesure manuelle de croissance peut être réalisé sur un grand nombre de plantes, mais a révélé la nécessité de mesurer la croissance de manière plus précise et surtout sans toucher les plantes.

Le risque de biais lié à la manipulation des plantes pour les mesurer ainsi que la possibilité que l'échelle de mesure ne soit pas suffisante pour identifier l'effet de la flexion nous ont poussés à mettre au point un système de mesure de la croissance en continu, par photographie. Des mesures de croissance par capteur de déplacement n'étaient pas possible en raison des mouvements de circumnutation. Le système de mesure par photographie développé est ainsi très intéressant car il minimise les perturbations mécaniques inhérentes à la mesure et offre une échelle de mesure plus fine.

Outre son intérêt pour la mesure de réponse de croissance, ce système permet de caractériser la croissance du peuplier et de la modéliser. Ainsi, dans nos conditions de culture,

la croissance du peuplier est rythmique et présente des phases, relativement dépendantes du cycle nyctéméral avec des mouvements de circumnutation en phase de croissance active nocturne et des phases d'arrêt de croissance diurne. Des rythmes similaires ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* et *Helianthus annuus* (Stolarz, 2009). Afin de comparer des résultats physiologiques et moléculaires, les stress ont toujours été appliqués à la même heure, soit 10 heures du matin afin d'éviter tout artefact généré par des variations de sensibilité selon le rythme circadien (Garner, 1996). La caractérisation de la croissance a ainsi permis de se rendre compte que le stress était appliqué en début de phase d'arrêt de croissance. Afin d'identifier la rapidité de transfert du signal, il serait donc intéressant de l'appliquer durant la scotophase, période de croissance active. De plus, pour identifier une durée de réponse, il serait pertinent de l'appliquer en début de phase de circumnutation, entre 18 et 19 heures. Ensuite, ce système de mesure permet d'identifier les composantes principales de la réponse de croissance longitudinale à un stress mécanique.

La première composante est un allongement de la phase d'arrêt de croissance diurne qui est significatif chez les plantes brûlées et non significatif chez les plantes fléchies pour un seuil de signification de 5%. Dans le cas de la brûlure, cet arrêt de croissance affecte une phase de croissance forte nocturne qui s'observe par la diminution de la croissance journalière. Ces résultats d'inhibition de croissance longitudinale après brûlure sont en accord avec la littérature (Braam, 2004). De plus, les mouvements foliaires de circumnutation sont inhibés. Récemment, Stolarz (2009) propose que l'inhibition de la circumnutation soit impliquée dans la régulation de l'inhibition de croissance longitudinale suite à des sollicitations mécaniques. La deuxième composante de réponse est une diminution de la vitesse de croissance la nuit suivant l'application du stress. Elle est significative pour la brûlure et peut être considérée comme significative pour un niveau de signification de 0.053 dans le cas de la flexion. Ces résultats montrant une réponse de croissance avec arrêt puis croissance diminuée est en accord avec les résultats de Coutand *et al.* (2000).

Notre étude physiologique des réponses de croissance ne permet pas de prouver que la flexion diminue significativement la croissance longitudinale du peuplier. Pruyne (2000) montre que certains hybrides du genre *Populus* ne présentent pas de réponses de croissance longitudinale à la flexion. Il est donc possible que l'hybride B117 étudié ne montre pas de réponses de croissance longitudinale à la flexion. Néanmoins, les résultats semblent indiquer une tendance de diminution de croissance qu'il serait nécessaire de confirmer ou d'invalider. En effet, l'étude n'a été réalisée que sur un faible nombre d'échantillons (3 répétitions

biologiques) et montre que si un arrêt de croissance est induit par une flexion, il s'agit d'un phénomène relativement court et donc non statistiquement significatif pour un échantillonnage de cette taille. Multiplier les répétitions pourrait ainsi permettre de valider l'hypothèse. C'est pourquoi nous proposons un système de traitement du signal de croissance cumulée qui soit automatisé afin de limiter un effet expérimentateur. La régression linéaire segmentée automatisée est proposée comme traitement de croissance cumulée du peuplier pour identifier des réponses de croissance. Elle a fourni des résultats d'analyse de variance, sur la durée des arrêts de croissance diurnes équivalents à l'analyse par segmentation manuelle. De plus les deux méthodes ont été comparées par test de Student pour données appariées afin de vérifier l'homogénéité des résultats qu'elles fournissent.

Nous avons ainsi développé une méthode de mesure de croissance longitudinale du peuplier par photographie, un système de traitement des photographies par analyse d'image et enfin un traitement automatisé des résultats de croissance cumulée par régression linéaire segmentée. Cette méthodologie pourra d'une part permettre de caractériser les cinétiques de transfert d'information induit par une flexion chez le peuplier, et d'autre part être exploitée pour l'analyse des réponses de croissance longitudinale à d'autres stress abiotiques.

Des gènes marqueurs du transfert d'information

L'étude des cinétiques d'expression des gènes mécanosensibles *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH3*, *Pta-TCH4* et *Pta-JAZ5* dans l'apex après sollicitation mécanique de la partie basale de la plante avait pour but de trouver des gènes marqueurs du transfert d'information.

Les cinétiques d'expression des gènes mécanosensibles *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH3*, *Pta-TCH4* et *Pta-JAZ5* après brûlure montrent une induction dès 30 minutes pour *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH4* et 1 heure pour le gène *Pta-JAZ5*. Ces gènes sont impliqués dans la mécanoperception au niveau du tissu fléchi (Martin, 2009). Ils sont également induits dans l'apex dès 30 minutes après brûlure. Ces résultats sont à valider par des répétitions biologiques. Ensuite, on peut noter que l'expression du gène *Pta-JAZ5* est induite après *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH4* suggérant qu'il intervient donc certainement en aval de la voie de régulation. De plus, cette étude suggère une implication de l'éthylène et des jasmonates dans la régulation d'une réponse à distance à la brûlure. Ces résultats concordent avec des études qui décrivent l'implication des jasmonates dans la signalisation à longue distance de réponse à la blessure chez *Arabidopsis thaliana* (Glauser, 2009, Zhang, 2008).

Les cinétiques d'expression des gènes mécanosensibles *Pta-ACS6*, *Pta-ZFP2*, *Pta-TCH2*, *Pta-TCH3*, *Pta-TCH4* et *Pta-JAZ5* après flexion ne présentent aucune induction. Des temps plus précoces ont aussi été testés sans aucun résultat. Il est difficile de conclure définitivement sur ces résultats. Le stress de flexion ne semblant pas aussi impactant que la brûlure au niveau des réponses de croissance, il est possible que la flexion n'entraîne pas une induction significative de ces gènes, ou alors que les gènes étudiés ne sont jamais induit pas la flexion au niveau de l'apex. L'induction pourrait encore être réalisée au niveau de méristèmes intercalaires sans que l'information n'atteigne le méristème apical (Coutand, 2000). Une des répétitions biologiques présentait des pics d'expression pour les gènes *ZFP2*, *TCH2* et *TCH4* deux heures après stress. Toutefois, l'intensité des pics était faible donc et non significative. Une troisième répétition devrait être réalisée pour valider les résultats. Chez *Bidens pilosa*, Vian (1996) rapporte qu'un stress non lésant (application de glace sur les racines) induit une expression de calmodulines dans la zone proximale au stress mais qui n'est pas observable dans une zone distale de la plante alors qu'un stress lésant (blessure) induit leur expression dans les deux zones. Ces résultats peuvent être mis en parallèles avec ceux obtenu par Martin (2009) chez le peuplier ainsi que ceux présentés ici. Les cinétiques d'expression de gènes mécanosensibles au niveau de l'apex après brûlure ou flexion sont fortement différentes en termes de quantité relative et suggèrent que le stress de brûlure lésant induit une réponse moléculaire au niveau de l'apex.

Le gène *Pta-TCH3* n'a présenté aucune variation de taux de transcripts après les deux types de stress au niveau de l'apex. Des résultats similaires ont été observés au niveau de tiges de peupliers fléchies (Fournier, communication personnelle). Il ne semble pas impliqué dans les réponses aux stress mécaniques dans ces deux organes chez le peuplier.

L'apex est un tissu en croissance présentant une activité cellulaire très intense et particulièrement au niveau de la production de protéines. Les gènes cibles présentaient des cycles seuil de PCR semi quantitative (CT) très élevés par rapport à un tissu de tige. C'est pourquoi il pourrait être intéressant de chercher d'autres marqueurs plus représentatifs de l'arrêt de croissance que de la mécanoperception. Ainsi, tester des cinétiques d'expression de marqueurs moléculaires de croissance de tel que des marqueurs de divisions cellulaire ou des marqueurs d'élongation pourrait être une alternative à tester. De plus, les PI (protéase inhibitors) ont été utilisés chez de nombreux modèles comme marqueurs de stress à distance notamment chez *Lycopersicon esculentum* (Farmer *et al.*, 1992). Il pourrait être intéressant de les tester comme marqueurs de réponse à distance aux flexions.

Conclusion et perspectives

Le stress lésant employé comme témoin positif d'un transfert d'information à longue distance induisant une inhibition de croissance longitudinale chez le peuplier peut être validé par notre étude. Les résultats physiologiques et moléculaires montrent des phénomènes de réponses qui sont en accord avec la littérature.

Une des questions majeure consistait à valider l'existence d'une diminution de croissance longitudinale en réponse à une flexion de la tige. Nos travaux ne permettent pas de répondre définitivement à cette question. Les perspectives proposées pour valider ou infirmer cette hypothèse sont de multiplier les répétitions via un système automatisé et d'appliquer la flexion à un autre moment de la journée. L'application du stress en fin de journée durant une phase de croissance active pourrait permettre d'amplifier la réponse de croissance longitudinale à la flexion, si elle existe chez l'hybride B117.

Le modèle de croissance rythmique du peuplier pose certaines difficultés pour l'étude du transfert d'information suite à un stress mécanique de part ses phases d'arrêt de croissance intrinsèques, qui peuvent gêner l'observation de réponses de croissance longitudinale. Si l'hypothèse de diminution de croissance longitudinale induite par une flexion est infirmée, l'étude du transfert d'information pourrait être réalisée sur le modèle de la tomate.

La tomate présente une croissance moins marquée par le cycle nyctéméral et sans arrêt de croissance (Coutand *et al.*, 2000). Les réponses de croissance à une flexion chez la tomate montrent deux composantes. La première composante est un arrêt de croissance, induit rapidement et dont la durée est peu variable et indépendante de l'intensité du stress. On pourrait parler de réponse à court terme. La rapidité de transmission (réponse induite en 8,3 minutes) doit prendre en compte le temps de perception et de génération du signal. Ensuite, la faible variabilité de durée de cette période peut suggérer qu'elle suive une loi de type tout-ou-rien. Cette composante de réponse pourrait être induite par un signal hydraulique et/ou électrique. La mécanoperception est rapidement suivie d'une génération de potentiel d'action (Telewski, 2006). De plus, la littérature présente déjà des cas d'induction d'arrêt de croissance longitudinale induits par potentiel d'action après stress électrique ou thermique chez *Luffa* (Fromm, 2007). Enfin, Fromm (2007) décrit aussi une corrélation entre l'induction de biosynthèse des jasmonates et des PI et l'induction d'une onde lente après blessure. La flexion peut être classée dans les stress non lésants. Pourtant, Stalberg (2005) rapporte la génération d'une onde lente après flexion, ce qui va à l'encontre des travaux de Julien (2003). Tous ces éléments de réflexion poussent à étudier ultérieurement l'influence des signaux électriques

dans la réponse longitudinale après flexion en comparaison du stress lésant de brûlure chez la tomate.

La deuxième composante de la réponse de croissance longitudinale à une flexion chez la tomate est une croissance diminuée pendant une durée qui a été corrélée à l'intensité du stress, soit la somme des déformations. Sur ce modèle expérimental des expériences de décortication annulaire (élimination du phloème) devraient permettre d'identifier le tissu vecteur du transfert d'information.

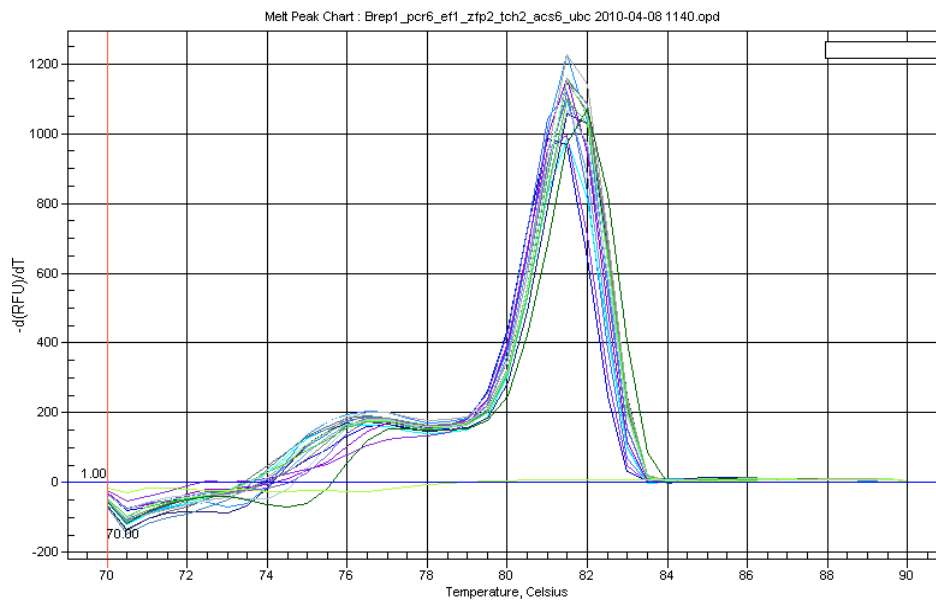
REFERENCES

- Almeras, T., Costes, E. and Salles, J. C.** (2004). Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. *Annals of Botany* **93**, 455-468.
- Azri, W., Chambon, C., Herbette, S., Brunel, N., Coutand, C., Leple, J. C., Rejeb, I. B., Ammar, S., Julien, J. L. and Roeckel-Drevet, P.** (2009). Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. *Physiologia Plantarum* **136**, 193-208.
- Braam, J.** (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* **165**, 373-389.
- Coutand, C., Chevolut, M., Lacoïnte, A., Rowe, N. and Scotti, I.** Mechanosensing of stem bending and its interspecific variability in five neotropical rainforest species. *Annals of Botany* **105**, 341-347.
- Coutand, C., Julien, J. L., Moulia, B., Mauget, J. C. and Guitard, D.** (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1813-1824.
- Coutand, C., Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Decourteix, M., Julien, J. L. and Moulia, B.** (2009). Strain Mechanosensing Quantitatively Controls Diameter Growth and PtaZFP2 Gene Expression in Poplar. *Plant Physiology* **151**, 223-232.
- Doare, O., Moulia, B. and De Langre, E.** (2004). Effect of plant interaction on wind-induced crop motion. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **126**, 146-151.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R. and Ryan, C. A.** (1992). Regulation of Expression of Proteinase-Inhibitor Genes by Methyl Jasmonate and Jasmonic Acid. *Plant Physiology* **98**, 995-1002.
- Fournier, M., Stokes, A., Coutand, C., Fourcaud, T. and Moulia, B.** (2006). Tree biomechanics and growth strategies in the context of forest functional ecology. *Ecology and Biomechanics*, 1-33.
- Fromm, J. and Lautner, S.** (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell and Environment* **30**, 249-257.
- Fuad-Hassan, A., Tardieu, F. and Turc, O.** (2008). Drought-induced changes in anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant Cell and Environment* **31**, 1349-1360.
- Garner, L. C. and Bjorkman, T.** (1996). Mechanical conditioning for controlling excessive elongation in tomato transplants: Sensitivity to dose, frequency, and timing of brushing. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 894-900.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S. A. R., Rudaz, S., Wolfender, J.-L. and Farmer, E. E.** (2009). Velocity Estimates for Signal Propagation Leading to Systemic Jasmonic Acid Accumulation in Wounded Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 34506-34513.
- Halle, F. and Edelin, C.** (1987). Tree architectural analysis. *Sixieme colloque sur les recherches fruitieres, 10-11 December 1986, Bordeaux.*, 5-19.
- Jaffe, M. J.** (1976). Thigmomorphogenesis - Detailed Characterization of Response of Beans (*Phaseolus-Vulgaris* L) to Mechanical Stimulation. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **77**, 437-453.

- Jaffe, M. J., Telewski, F. W. and Cooke, P. W.** (1984). Thigmomorphogenesis - on the Mechanical-Properties of Mechanically Perturbed Bean-Plants. *Physiologia Plantarum* **62**, 73-78.
- James, K. R., Haritos, N. and Ades, P. K.** (2006). Mechanical stability of trees under dynamic loads. *American Journal of Botany* **93**, 1522-1530.
- Julien, J. L. and Frachisse, J. M.** (1992). Involvement of the Proton Pump and Proton Conductance Change in the Wave of Depolarization Induced by Wounding in *Bidens-Pilosa*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **70**, 1451-1458.
- Julien, J. L. and Frachissestoiljkovic, J. M.** (1994). Abrasion Is a Suitable Technique for Electrophysiological Investigation of the Slow-Wave. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 583-589.
- Kehr, J. and Buhtz, A.** (2007). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **146**, DOI 10.1016/j.cbpa.2007.01.553|18.
- Kern, K. A., Ewers, F. W., Telewski, F. W. and Koehler, L.** (2005). Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology* **25**, 1243-1251.
- Lautner, S., Grams, T. E. E., Matyssek, R. and Fromm, J.** (2005). Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* **138**, 2200-2209.
- Malone, M.** (1996). Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in Botanical Research, Vol 22* **22**, 163-228.
- Malone, M., Alarcon, J. J. and Palumbo, L.** (1994). An Hydraulic Interpretation of Rapid, Long-Distance Wound Signaling in the Tomato. *Planta* **193**, 181-185.
- Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Azri, W., Lenne, C., Henry, C., Coutand, C. and Julien, J. L.** (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.
- Martin, L., Leblanc-Fournier, N. et al.** (2010). "Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings." *Journal of Experimental Botany* **61**(9): 2403-2412.
- McCormack, E., Velasquez, L., Delk, N. A. and Braam, J.** (2006). Touch-responsive behaviors and gene expression in plants. *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life*, 249-260.
- Neumann, P. M.** (2007). Evidence for long-distance xylem transport of signal peptide activity from tomato roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2217-2223.
- Niinuma, K., Someya, N., Kimura, M., Yamaguchi, I. and Hamamoto, H.** (2005). Circadian rhythm of circumnutation in inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1423-1427.
- Nuutinen, T., Matala, J., Hirvela, H., Harkonen, K., Peltola, H., Vaisanen, H. and Kellomaki, S.** (2006). Regionally optimized forest management under changing climate. *Climatic Change* **79**, 315-333.
- Pfaffl, M. W., Lange, I. G., Daxenberger, A. and Meyer, H. H. D.** (2001). Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR (Reprinted from vol. 109, pg. 345, 2001). *Apmis* **109**, S540-S550.
- Pilet, P. E.** (1953). Les mouvements des végétaux. *Presses universitaires de Frances*. EDIT. N°23.287

- Pruyn, M. L., Ewers, B. J. and Telewski, F. W.** (2000). Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiology* **20**, 535-540.
- Richter, T. and Fukshansky, L.** (1994). Authentic in-Vivo Absorption-Spectra for Chlorophyll in Leaves as Derived from in-Situ and in-Vitro Measurements. *Photochemistry and Photobiology* **59**, 237-247.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 675-709.
- Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E. and Ledoigt, G.** (2006). Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiologia Plantarum* **128**, 283-288.
- Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E. and Ledoigt, G.** (2008). High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m⁻¹) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta* **227**, 883-891.
- Schafer, E., Beggs, C. J., Fukshansky, L., Holmes, M. G. and Jabben, M.** (1981). A Comparative-Study of the Responsivity of *Sinapis-Alba* L Seedlings to Pulsed and Continuous Irradiation. *Planta* **153**, 258-261.
- Scurfield, G.** (1973). Reaction wood: its structure and function. *Science, USA* **179**, 647-655.
- Stahlberg, R., Cleland, R. E. and Van Volkenburgh, E.** (2005). Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in *Helianthus annuus* L. shoots. *Planta* **220**, 550-558.
- Stolarz, M.** (2009). Circumnutation as a visible plant action and reaction: physiological, cellular and molecular basis for circumnutations. *Plant Signal Behav* **4**, 380-7.
- Telewski, F. W.** (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93**, 1466-1476.
- Telewski, F. W. and Jaffe, M. J.** (1986). Thigmomorphogenesis - Anatomical, Morphological and Mechanical Analysis of Genetically Different Sibs of *Pinus-Taeda* in Response to Mechanical Perturbation. *Physiologia Plantarum* **66**, 219-226.
- Telewski, F. W. and Jaffe, M. J.** (1986). Thigmomorphogenesis - Field and Laboratory Studies of *Abies-Fraseri* in Response to Wind or Mechanical Perturbation. *Physiologia Plantarum* **66**, 211-218.
- Telewski, F. W. and Pruyn, M. L.** (1998). Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* **18**, 65-68.
- Vian, A., HenryVian, C., Schantz, R., Ledoigt, G., Frachisse, J. M., Desbiez, M. O. and Julien, J. L.** (1996). Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants? *Febs Letters* **380**, 93-96.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. and Miersch, O.** (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**, 297-306.
- Yan, X. F., Wang, Z. Y., Huang, L., Wang, C., Hou, R. F., Xu, Z. L. and Qiao, X. J.** (2009). Research progress on electrical signals in higher plants (vol 19, pg 531, 2009). *Progress in Natural Science* **19**, 1851-1851.
- Zhang, Y. and Turner, J. G.** (2008). Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis. *Plos One* **3**.
- Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithofer, A., Boland, W. and Felle, H. H.** (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplasmic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* **149**, 1593-1600.

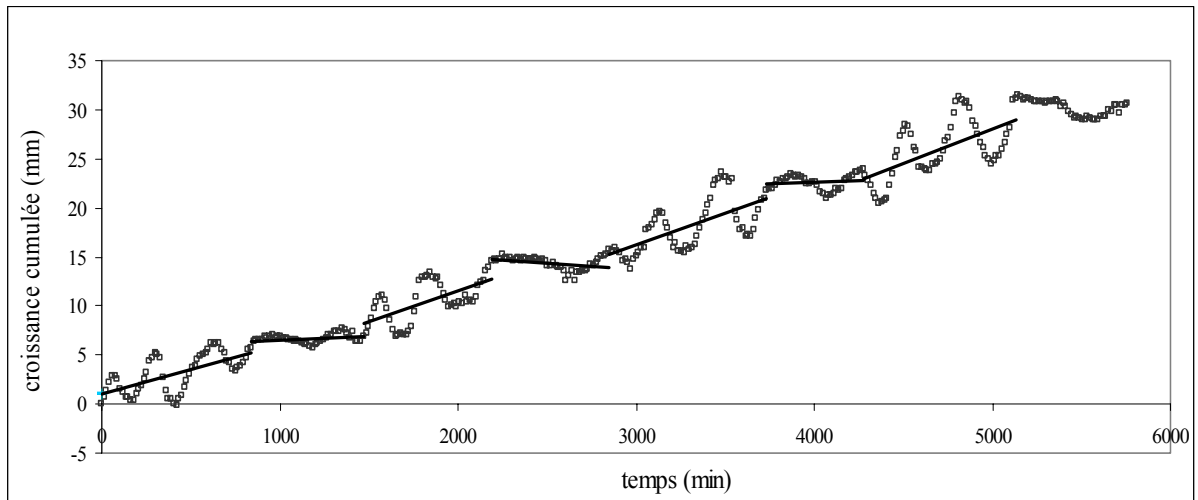
Annexe 1



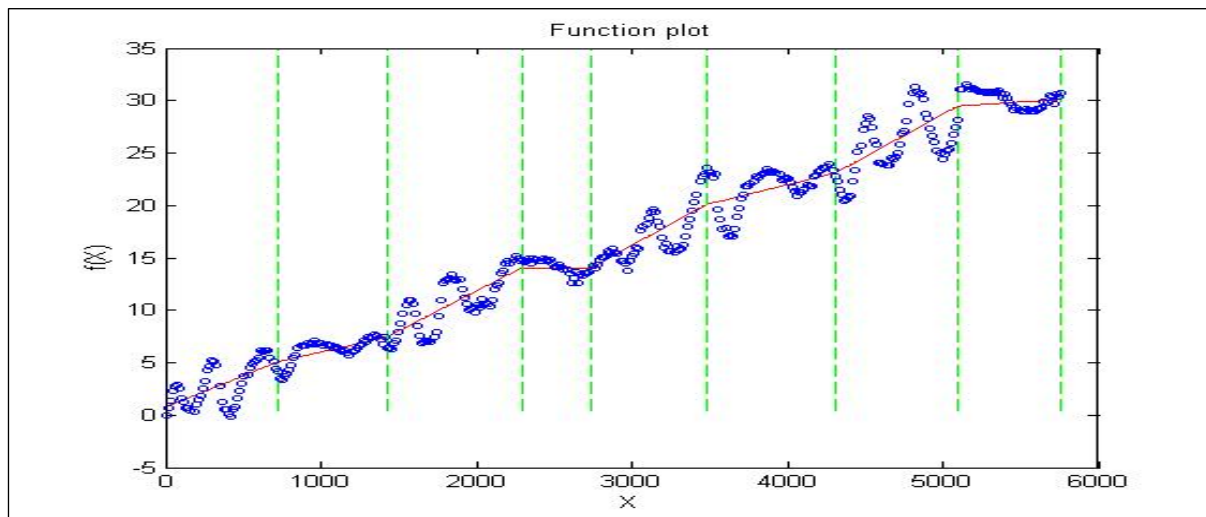
Validation de la spécificité des amorces du gène *Pta-UBC* pour leur séquence cible par contrôle de la courbe de dénaturation des ADNc en fonction de la température. La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN bicaténaire. Le graphique présente la dérivée de la fluorescence en fonction de la température. Un seul pic caractéristique de la séquence *Pta-UBC* amplifiée à une température d'hybridation spécifique est observable.

Annexe 2

a)



b)



Comparaison des méthodes de régression segmentée manuelle (a) et automatisée (b) pour la croissance cumulée d'une plante témoin.