



Vulnérabilité du xylème à la cavitation : de l'écophysiologie aux bases génétiques

Stéphane Herbette

► To cite this version:

Stéphane Herbette. Vulnérabilité du xylème à la cavitation : de l'écophysiologie aux bases génétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2011. tel-02804174

HAL Id: tel-02804174

<https://hal.inrae.fr/tel-02804174>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Mémoire présenté par
Stéphane Herbette

Pour l'obtention de l'
Habilitation à Diriger des Recherches

07 Juin 2011

Rapporteurs :

Franck Brignolas

Jean-Marc Lobaccaro

Gregory Mouille

Professeur, Université d'Orléans

Professeur, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand)

Chargé de Recherches, INRA, Versailles

Examinatrices

Patricia Roeckel-Drevet

Deborah Goffner

Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Directrice de Recherches, CNRS, Toulouse

Sommaire

I	Curriculum Vitae.....	2
	Situation actuelle	2
I.1	Etudes et diplômes universitaires	2
I.2	Expériences professionnelles scientifiques	2
II	Activités de formation.....	3
II.1	Enseignement	3
II.2	Responsabilités pédagogiques et administratives	5
II.3	Encadrements d'étudiants	5
	II.3.1 Licence et Master	5
	II.3.2 Doctorants	6
III	Activités scientifiques	7
III.1	Responsabilités scientifiques.....	7
III.2	Publications et communications scientifiques.....	8
	III.2.1 Publications scientifiques avec comité de lecture	8
	III.2.2 Actes de conférences	10
	III.2.3 Articles de vulgarisation.....	11
	III.2.4 Communications orales	11
	III.2.5 Communications par affiches	13
IV	Synthèse des travaux scientifiques	15
IV.1	Résumé des travaux de la thèse de doctorat	15
IV.2	Résumé de l'activité du stage post-doctoral.....	17
IV.3	Travaux de recherche sur l'arbre.....	19
	IV.3.1 Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier.	20
	IV.3.2 Etude de la tolérance au froid de l'hévéa.	21
	IV.3.3 Activités de recherche sur l'hydraulique des arbres.....	22
	IV.3.3.1 Contexte des recherches.	22
	IV.3.3.2 Variabilité de la VC à l'échelle intra-spécifique.....	24
	IV.3.3.3 Déterminismes moléculaires de la VC.	27
IV.4	Bilan des activités de recherche sur l'arbre.....	29
V	Perspectives de recherche.....	31
V.1	Bases structurales, moléculaires et génétiques de la VC.	31
	V.1.1 Caractérisation des ponctuations.....	31
	V.1.2 Bases génétiques de la VC.	35
V.2	Importance fonctionnelle de la VC	36
	V.2.1 Impacts physiologiques de la cavitation.....	37
	V.2.2 Rôle adaptatif de la VC.	37
	V.2.3 Plasticité de la vulnérabilité à la cavitation.....	38
	V.2.4 Compromis avec d'autres caractères.....	39
V.3	Fonctionnement hydraulique.....	41
	V.3.1 Réparation de l'embolie	41
	V.3.2 Contrôle « pariétal » de la résistance hydraulique (RH) foliaire.....	42
V.4	Le choix de l'espèce végétale.....	43
VI	Conclusions	44
VII	Références citées	45

I Curriculum Vitae

Herbette Stéphane

Né le 21 Décembre 1976 à Amiens (Somme), PACSE, 2 enfants.

Adresse : Bouteix, 63190 Bort l'Etang.

Situation actuelle

Maître de conférences de l'Université Blaise Pascal, depuis septembre 2005, section CNU 66.

UMR-547 PIAF (INRA-Université Blaise Pascal)

24, Avenue des Landais, F - 63177 AUBIERE cedex

Tel : +33(/0) 473 40 79 28, FAX : +33(/0) 473 40 79 16

Courriel : Stephane.herbette@univ-bpclermont.fr

I.1 Etudes et diplômes universitaires

1996 DEUG « Sciences de la vie – Biologie », mention AB.

1997 Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie, mention B.

1998 Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, mention AB.

2000 DEA Physiologie et Génétique Moléculaires, mention AB.

2004 Doctorat d'université, spécialité Physiologie et Génétique Moléculaires.

« Rôle des phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydases (PHGPX) dans la réponse au stress chez les végétaux ». Soutenu le 04 Mars 2004.

Financement : Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Directeur de thèse : Pr P. Roeckel-Drevet.

I.2 Expériences professionnelles scientifiques

2000-2003 : Vacataire en enseignement à l'université Blaise Pascal.

2003-2004 : ATER (1/2 temps) à l'Université Blaise Pascal.

2004-2005 : Stage post-doctoral au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) de St Paul-Lez-Durance (13), au sein du Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation. Sujet : Analyse du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à un traitement au Cadmium. Direction : Dr. Nathalie Leonhardt.

09/2005-...: Maître de Conférences de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand).
Membre de l'UMR 547-PIAF (INRA– Université Blaise Pascal), et de l'équipe HYDRO (Hydraulique et résistance à la sécheresse des ligneux), dirigée par le Dr. Hervé Cochard (DR INRA).

II Activités de formation

II.1 Enseignement

Mon service d'enseignement en qualité de Maître de Conférences s'effectue au sein du Département de Biologie de l'U.F.R. Sciences et Technologies.

Mes activités d'enseignements évoluant chaque année, seuls les enseignements dispensés cette année 2010-2011 seront détaillés. Les activités révolues seront succinctement mentionnées.

- Biologie Cellulaire (Licence 1^{ère} année, UFR ST, CM-TP)

Le but de cet enseignement est de fournir à l'étudiant une vision globale et intégrée des structures et compartiments et du fonctionnement des cellules procaryotes et eucaryotes. La partie pratique concerne l'étude par microscopie de différentes structures cellulaires et leur fonctionnement au sein d'une cellule.

- Biodiversité des végétaux (Licence 3^{ième} année, Terrain, TP-TD)

Responsable du Module.

Ce module décrit la classification des différents groupes de végétaux. En suivant le schéma des nouvelles classifications phylogénétiques, les caractéristiques générales (organisation structurale, reproduction, écologie, etc.) de chaque groupe systématique sont précisées et comparées. Je réalise des TP en salle pendant lesquels les notions de cours sont illustrées par l'étude de structures propres aux végétaux étudiés, ainsi que des TP « terrain » de botanique destinés à la reconnaissance des principales familles d'Angiospermes, et des espèces végétales les plus courantes (herbacées, ligneuses, fougères, mousses).

- Ecole pédagogique de terrain (Master 1^{ère} année, Terrain)

L'objectif de ce module est de dispenser des enseignements naturalistes de terrain pour préparer des étudiants de Master aux métiers de l'enseignement des Sciences de la Vie et de la Terre. Dans le cadre de ce module, j'encadre un TD et un TP de cartographie végétale. L'objectif est double : 1) donner les notions et les clefs d'analyses de la cartographie végétale, 2) présenter les séries de végétation de la région, leur répartition et leur relation avec les principaux facteurs environnementaux.

- Stage de botanique et d'écologie végétale (Master 1^{ère} année, TP)

Responsable du Module.

J'encadre un stage de 10 jours à la station biologique de Besse (63). Les objectifs sont l'initiation et le perfectionnement à la reconnaissance de la flore et l'étude des groupements

végétaux en relation avec leurs milieux. La formation est essentiellement dispensée sur le terrain, et complétée par quelques séances en salles.

- Ecophysiologie, biodiversité et amélioration des écosystèmes prairiaux (Master 2^{ième} année, TD)

Responsable du Module.

Les objectifs de ce module sont de maîtriser les connaissances scientifiques et appliquées des écosystèmes prairiaux, et de connaître les enjeux environnementaux et agronomiques des prairies afin de devenir une force de proposition dans la gestion et l'amélioration de ces milieux. Outre la gestion du contenu et des interventions dans ce module, j'encadre des TD d'analyses et de restitutions d'articles scientifiques relatifs aux problématiques soulevées par les multiples intervenants.

-Autres Enseignements dispensés de 2005 à 2009 :

- Informatique (Licence 1^{ière} année, TP).

Initiation à l'utilisation de logiciels d'exploitations et d'applications.

- Ecologie générale (Licence 1^{ière} année, Cours – TD-TP).

Cours sur les biomes terrestres, TD sur l'écosystème forestier, TP sur la forêt transitoire.

- Métabolites secondaires (Licence 3^{ième} année, Cours-TD-TP).

Cours et TD sur les voies de biosynthèse des métabolites secondaires chez les animaux et chez les végétaux. TP d'extraction de certains métabolites.

- Stage de biologie marine (Master 1^{ière} année, TD-TP).

Les milieux du littoral (estran sableux et rocheux, dune, slikke et schorre) avec leurs caractéristiques écologiques et les principales espèces végétales (herbacées ou algues).

- Morphologie et Anatomie végétale (Master 1^{ière} année, TP).

Présentations des organes et des tissus spécialisés chez les hydrophytes, en relation avec les contraintes du milieu aquatique.

- Ecologie végétale (Préparation CAPES-Aggregation, TD).

La dynamique de végétation et les successions des groupements de végétation.

- Physiologie végétale du stress (Master Pro, 2^{ième} année, Cours).

Rôle du métabolisme oxydant dans la réponse aux stress chez les végétaux.

Volumes horaires d'enseignements dispensés:

2005-2006 : 193 h équivalent TD (Licence 166 h, Master 27 h).

2006-2007 : 197 h eq. TD (Licence 164 h, Master 33 h).

2007-2008 : 203 h eq. TD (Licence 152 h, Master 51 h).

2008-2009 : 216 h eq. TD (Licence 109 h, Master 107 h).

2009-2010 : 223 h eq. TD (Licence 105 h, Master 118 h).

2010-2011: 201 h eq. TD (Licence 123 h, Master 78 h).

II.2 Responsabilités pédagogiques et administratives

-2007-2008 : Responsable du parcours « Biologie des Organismes, des Populations et des Ecosystèmes » de la Licence de Biologie de l'Université Blaise Pascal.

-2006-2009 : Tuteur pédagogique des étudiants du dispositif « sportifs de haut et bon niveau ».

-2006-2009 : Membre élu de la commission de spécialistes de l'Université Blaise Pascal – CNU 66.

-Depuis 2005 : Tuteur pédagogique d'étudiants de Master 2^{ième} année en stage.

-Depuis 2006 : Responsable de 3 modules d'enseignements.

-Depuis 2009 : Membre du groupe d'expert de la CNU 66 de l'Université Blaise Pascal.

-Depuis 2010 : Organisation de la répartition des heures d'enseignement de biologie végétale.

-Depuis 2010 : Responsable d'une Licence Professionnelle « gestion durable des végétaux ligneux d'ornement ». Un dossier de demande d'habilitation a été soumis pour une ouverture en Septembre 2012.

II.3 Encadrements d'étudiants

II.3.1 Licence et Master

-Licence (Université Blaise Pascal)

Encadrement de deux étudiants de Licence dans le cadre du module d'enseignement « Découverte du milieu recherche » (2*40h) : Aude Tixier (2008) et Titouan Bonnot (2011).

-BTS de Biotechnologie (Lycée Simone Weil, Puy-en-Velay)

2008 : Thomas Douellou (2 mois) : Stage de technicien supérieur sur le sujet : « *Etude de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme pariétal chez le peuplier : mise au point des conditions expérimentales* ».

-Master Génétique et Physiologie, 1^{ière} année (Université Blaise Pascal)

2006 : Vincent Desforges (3 mois) : « *Modulation de la croissance et de quelques propriétés hydriques du bouleau et du hêtre en fonction du niveau de sécheresse édaphique* ».

-Master 3A (Agronomie et AgroAlimentaire), spécialité «Horticulture Méditerranéenne et Tropicale» (SupAgro Montpellier)

2010 : Wanploy Jinagool (5 mois). Bourse du programme Erasmus Mundus : « *A Study on genetic variability for drought tolerance in perennial trees* ».

II.3.2 Doctorants

-Wassim Azri (20%). thèse du 01/09/2004 au 07/03/2009. Allocation MENRT de Tunisie. « *Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier (Populus tremula x Populus alba)* ». Directrice : Pr. Patricia Roeckel-Drevet (UBP).

- 1 article en 1^{ier} auteur dans une revue à comité de lecture.
- 1 article scientifique en second auteur dans une revue à comité de lecture.
- 3 communications (orale et par affiches).

-Jing Mai (30 %). Thèse du 01/12/2005 au 01/06/2010. Financement : MICHELIN. « *Etude de la tolérance au froid chez l'Hévéa par des approches écophysiologiques et moléculaires* ». Directrice : Pr. Patricia Roeckel-Drevet (UBP).

- 2 articles scientifiques en 1^{ier} auteur dans des revues à comité de lecture.
- 1 article scientifique dans une revue sans comité de lecture.
- 10 communications (orales et par affiches).

-Hosam Awad (50 %). Début de thèse le 01/09/2007. Allocation du Bureau Culturel de l'Ambassade d'Egypte. Directeur : Dr. Hervé Cochard (INRA). « *Bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier* ».

- 1 article scientifique en 1^{ier} auteur et 1 autre article en 3^{ième} auteur dans des revues à comité de lecture.
- 1 communication orale.

-Rémi Wortemann (30 %). Début de thèse le 01/09/2008. Financement MENRT. Directeurs : Dr. Hervé Cochard (INRA) et Pr. Patricia Roeckel-Drevet (UBP). « *Etude de la résilience à la sécheresse chez le hêtre (Fagus sylvatica L.) : Plasticité phénotypique et variabilité génétique de la vulnérabilité à la cavitation* ».

- 1 article en 2^{ième} auteur dans une revue à comité de lecture.
- 5 communications (orales et par affiches).

-Aude Tixier (30 %). Début de thèse le 01/10/2010. Financement MENRT. Directeurs : Dr. Hervé Cochard (INRA) et Pr. Steven Jansen (Université Ulm, Allemagne). « *Rôle du Calcium et du Bore dans la vulnérabilité du xylème à la cavitation chez les arbres* ».

III Activités scientifiques

III.1 Responsabilités scientifiques

-2006-2008 : Membre du conseil de service l'UMR PIAF.

-2007-2009 : Responsable scientifique et technique d'un projet BQR. Titre: Identification de gènes responsables de la résistance à la cavitation chez le hêtre (*Fagus sylvatica*). Coût du projet : 30300 euros.

-2009-2010 : participant comme expert français à un programme EGIDE (N° 19117YM) franco-marocain. Titre: Etude des ressources génétiques du caroubier en vue de sélectionner des cultivars résistants au stress hydrique.

-2010 : Membre d'un jury de thèse. Doctorant : Jing Mai. Titre de la thèse : « Etude de la tolérance au froid chez l'Hévéa par des approches écophysiologiques et moléculaires ».

-2010-2014 : Responsable scientifique d'une tâche scientifique d'un projet ANR programme blanc « Déterminismes biophysiques et moléculaires de la vulnérabilité à l'embolie chez les arbres ». Impliqué à hauteur de 30 personnes.mois, j'ai participé à la rédaction de ce projet, je suis responsable d'une des 3 tâches scientifiques du projet et je fais partie du comité de pilotage.

-2011-2013 : Responsable d'un projet PHC (Partenariat Hubert Curien)-SIAM franco-thaïlandais « Phénotypage de la tolérance à la sécheresse chez l'hévéa ». Ce projet a pour objectif de construire un réseau de chercheurs en génétique, biologie moléculaire et écophysiologie avec l'Université de Kasetsart (Bangkok), le RRIT (Rubber Research Institute of Thailand), le CIRAD (Montpellier et Bangkok), l'UMR PIAF, de l'UMR EEF (Ecologie et Ecophysiologie Forestière, Nancy) pour développer des méthodes de phénotypage de la tolérance à la sécheresse chez l'hévéa.

-Depuis 2007 : Président de l'association botanique DIGITALIS.

-Depuis 2011 : Membre du conseil scientifique des CEN (Conservatoires des Espaces Naturels) d'Auvergne.

Depuis 2011 : Membre du CSRPN (Conseil Scientifique Régional du Patrimoine Naturel) d'Auvergne.

En plus de ma participation à 3 comités de thèses que je co-encadre au sein de l'UMR PIAF, j'ai été ou je suis membre extérieur d'autres comités de thèses:

-2006-2010. Doctorant Régis Fichot. Sujet : Variabilité structurale et fonctionnelle du xylème et plasticité en réponse à la sécheresse chez le peuplier. Laboratoire LBLGC (Université Orléans) et UR AGPF 588 (INRA Orléans). Directeurs : Pr. F. Brignolas et Dr. G. Pilate.

-Depuis 2008. Doctorante Elodie Layat. Sujet : Rôle de la protéine TruncTFIIIA, un variant d'épissage du gène TFIIIA, dans la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S. UMR 6547-GEEM (Université Blaise Pascal – CNRS). Directrice: Dr. S. Tourmente.

-Depuis 2008. Doctorant Jean-Baptiste Lamy. Sujet : Déterminismes et architecture génétique de la résistance à la cavitation chez *Pinus pinaster*. UMR BIOGECO (INRA – Université de Bordeaux I). Directeurs : Dr. C. Plomion.

-Depuis 2010. Doctorant Jeremie Santini. Sujet : Etude du rôle de la pression oxydative dans la sélection adaptative des espèces ancestrales d'agrumes par l'analyse de la capacité photosynthétique et des mécanismes de gestion du stress photo-oxydant. Université de Corse et UR GEQA (INRA de Corse). Directrice : Pr. L. Berthi.

III.2 Publications et communications scientifiques

III.2.1 Publications scientifiques avec comité de lecture

1- Herbette S, Lenne C, Leblanc-Fournier N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. **2002**.

Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities **FEBS Journal**, 269: 2414-2420

- 2- Branlard G, Amiour N, Igrejas G, Gaborit T, Herbette S, Dardevet M, Marion D. **2003**. Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3: 168-174.
- 3- Herbette S, Lenne C, Tourvieille de Labrouhe D, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. **2003**. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiologia Plantarum* 119: 418-428.
- 4- Herbette S, Brunel N, Prensier G, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. **2004**. Immunolocalization of a plant glutathione peroxidase-like protein. *Planta*, 219: 784-789.
- 5- Herbette S, Le Menn A, Rousselle P, Améglio T, Faltin Z, Branlard G, Eshdat Y, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. **2005**. Modification of photosynthetic regulation in tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta-General subjects*, 1724: 108-118 .
- 6- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Pietta L, Magniette-Martin LM, Cuinea S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N. **2006**. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, 88: 1751-1765.
- 7- Cochard H, Venisse JS, Barigah S, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree M, Sakr S. **2007**. Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiology*, 143: 122-133.
- 8- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. **2007**. Seleno-independent glutathione peroxidases - More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal*, 274: 2163-2180.
- 9- Azri W, Chambon C, Herbette S, Brunel N, Coutand C, Leplé JC, Ben Rejeb I, Ammar S, Julien JL, Roeckel-Drevet P. **2009**. Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. *Physiologia Plantarum*, 136: 193-208.
- 10- Mai J, Herbette S, Vandame M, Kositsup B, Kasemsap P, Cavalac E, Julien JL, Améglio T, Roeckel-Drevet P. **2009**. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Trees - structure and function*, 23: 863-874.

- 11-Cochard H, Holta T, Herbette S, Delzon S, Mencuccini M. **2009**. New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. *Plant Physiology*, 151: 949-954.
- 12-Cochard H, Herbette S, Hernandez E, Holta T, Mencuccini M. **2010**. The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *Journal of Experimental Botany*, 61: 275-285.
- 13-Awad H, Barigah T, Badel E, Cochard H, Herbette S. **2010**. Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*, 139: 280-288.
- 14-Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel E, Ennajeh M, Vilagrosa A. **2010**. Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant, Cell & Environment*, 33: 1543-1552.
- 15-Herbette S, Cochard H. **2010**. Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant Physiology*, 153: 1932-1939.
- 16-Herbette S, Wortemann R, Awad H, Huc R, Cochard H, Barigah T. **2010**. Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology*, 30: 1448-1455.
- 17-Mai J, Herbette S, Vandame M, Cavaloc E, Julien J-L, Améglio T, Roeckel-Drevet P. **2010**. Contrasting strategies to cope with chilling stress of a tropical tree, *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiology*, 30: 1391-1402.
- 18-Herbette S, Tourvieille de Labrouhe D, Drevet JR, Drevet P. **2011**. Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. *Plant Science*, 180: 548-553.

III.2.2 Actes de conférences

- Herbette S, Tourvieille de Labrouhe D, Lenne C, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. **2003**. Characterization of glutathione peroxidase (GPX)-like genes in higher plants. *Free radical research*, 37, S2 : 23.
- Mai J, Herbette S, Cavaloc E, Julien JL, Améglio T, Drevet P. **2008**. A comparative study of *Hevea* clones PB 260 and YunYan 77-4 for chilling tolerance. Natural Rubber Conference IRRDB (International Rubber Research Development Board); Selangor (MYS), 13 pp.

III.2.3 Articles de vulgarisation

- Herbette S. 2007. Les adaptations des hydrophytes aux milieux aquatiques. **Digitalis** (ISSN 1638 3958), 6 : 11-16.
- Herbette S. 2009. La macre nageante (*Trapa natans* L.) : une plante rare qui peut se révéler envahissante. **Digitalis**, 8 : 1-4.
- Herbette S., Tort M. 2009. La flore et l'écologie des pelouses : étude de quelques exemples en Auvergne. **Digitalis**, 8 : 14-30.

III.2.4 Communications orales

- Herbette S., Leblanc N, Drevet J, Garin J, Faure G, Herbette S. Rôle des phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydases (PHGPX) dans la réponse au stress chez les végétaux. Congrès de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé, Clermont-Ferrand, France, 7-8 March 2002.
- Herbette S., Taconnat L, Martin Magniette ML, Renou JP, Auroy P, Richaud P, Cuine S, Hugouvieux V, Bourguignon J, Forestier C, Vavasseur A, Leonhardt N. Analyse de la réponse précoce du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* au cadmium. Congress of Environmental Nuclear Toxicology, Auteuil, France, 13-14 December 2004.
- Mai J, Herbette S., Julien JL, Ameglio T, Roeckel-Drevet P. Etude écophysiological et moléculaire de la résistance au froid chez l'hévéa. Séminaire sur la biologie moléculaire de l'hévéa, Montpellier, France, 3 February 2006.
- Azri W, Ben Rejeb I, Mai J, Herbette S., Ammar S, Julien JL, Roeckel-Drevet P. Proteome analysis of poplar stem under gravitational stimulation. Congress of the French Society of Electrophoresis and Proteomics. St Malo, France, 16-18 October 2006.
- Cochard H, Herbette S. 2007. Traits Hydrauliques et Résistance à la Sécheresse des Arbres. Journée « Tolérance à la sécheresse chez les ligneux Pour une approche concertée entre généticiens et écophysiologistes » Bordeaux, Décembre 2007.
- Barigah TS, Cochard H, et Herbette S. 2007 - Diversité intra- et inter-spécifique des caractéristiques hydrauliques du hêtre. Poster à REGEFOR, l'atelier recherche et gestion forestières, Forêts mélangées : quels scénarios pour l'avenir? Champenoux, 26-28 juin 2007.
- Barigah TS, Cochard H, Huc R, Ducrey M, Herbette S. Plasticité phénotypique des caractéristiques hydrauliques du hêtre. ECOGER Workshop, Montpellier, France, July 2008.

- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Delzon S, Vilagrosa A 2008 Cavitation et résistance à la sécheresse des ligneux. Séminaire du groupe « Xylème », Clermont-Ferrand, 24-25 novembre 2008.
- Herbette S, Awad S, Barigah T, Cochard H. Bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation du xylème. Séminaire du groupe « Xylème », Clermont-Ferrand, 24-25 novembre 2008.
- Barigah TS, Beauquin S, Desforges V, Herbette S et Cochard H. 2008 - Modulation des caractéristiques hydrauliques de trois espèces d'arbres en fonction du niveau de sécheresse édaphique. Séminaire du groupe « Xylème », Clermont-Ferrand, 24-25 novembre 2008.
- Barigah TS, Herbette S, Huc R, Ducrey M et Cochard H. 2008 - Plasticité phénotypique des caractéristiques hydrauliques du hêtre. *La plasticité phénotypique des arbres*, séminaire du Groupe d'Etude de l'Arbre, Montpellier, 2-3 octobre 2008.
- Mai J, Herbette S, Cavaloc E, Julien JL, Ameglio T, Drevet P. Etude de la tolérance au froid chez hevea Brasiliensis. 10^{ième} rencontres du groupe de Biologie Moléculaire des Ligneux (BML10); Nancy, France, 2008.
- Mai J, Herbette S, Cavaloc E, Julien JL, Améglio T, Drevet P. Etude de la tolérance au froid chez *Hevea brasiliensis* par des approches écophysiologiques et moléculaires. [Communication orale]. Forum de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé, Clermont-Ferrand, France; March 2008.
- Fichot R, Barigah T, Chamaillard S, Le Thiec D, Laurans F, Herbette S, Cochard H & Brignolas F. 2009 Plasticité de la croissance de la résistance à la cavitation et des caractères anatomiques du xylème en réponse à la sécheresse chez *Populus deltoides* x *Populus nigra*. Séminaire du groupe « Xylème », Bordeaux, Novembre 2009.
- Barigah TS, Charrier O, Herbette S et Cochard H. Drying without dying: do potted saplings of *Fagus sylvatica* design more resistant branches in response to gradual soil drought? Séminaire de fin du programme "Ecoger", Champenoux, 6-7 Octobre 2009.
- Barigah TS, Charrier O, Herbette S et Cochard H. Etude de la résilience de jeunes plants de hêtre à la sécheresse édaphique. Séminaire du groupe « Xylème », Bordeaux, Novembre 2009.
- Wortemann R, Herbette S, Barigah T, Ducouso A, Fumanal B, Roeckel-Drevet P, Cochard H. Variability of the vulnerability to xylem cavitation in European beech provenances. Seminar of the COST action E52 Beech Genetic resources for sustainable forestry in Europe, Thessaloniki, Grece, 2009.

Wortemann R, Herbette S, Barigah T, Ducouso A, Fumanal B, Roeckel-Drevet P, Cochard H. Etude de la résilience à la sécheresse chez le hêtre (*Fagus sylvatica*): Plasticité phénotypique et variabilité génétique de la vulnérabilité à la cavitation. Séminaire du groupe “Xylème”, Bordeaux, Novembre 2009.

Awad H, Barigah T, Badel E, Cochard H, Herbette S 2009 Poplar vulnerability to cavitation acclimates to water stress. Séminaire du groupe “Xylème”, Bordeaux, Novembre 2009.

Cochard H, Herbette S, Kajji A. Fonctionnement hydraulique et adaptation des arbres aux stress hydriques. Séminaire PRAD-Maroc « L’adaptation des plantes aux stress abiotiques ». Rabat, Maroc, 6 Juin 2010.

Herbette S, Tixier A, Awad H, Barigah T, Mellerowicz E, Cochard H. Calcium et vulnérabilité à la cavitation. Séminaire du groupe “Xylème”, Nancy, 1-3 Décembre 2010.

III.2.5 Communications par affiches

Herbette S, Leblanc N, Drevet J, Garin J, Faure G, Julien JL, Lenne C. Study of translational regulation of a glutathione peroxidase following a mechanical stimulation applied on a tomato (*Lycopersicon esculentum*) internode. French Society of Plant Physiology, Besançon, France, 5-7 december 2000.

Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. Characterization of two glutathion peroxidase-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus*. Fifth conference on oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Nice, France, 19-21 November 2001.

Herbette S, Tourvieille de Labrouhe D, Lenne C, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. Characterization of glutathione peroxidase-like genes in higher plants. Conference on plant stress, reactive oxygen and antioxidants, Friesing, Germany, September 19-21th 2003.

Herbette S, Taconnat L, Martin Magniette ML, Renou JP, Auroy P, Richaud P, Cuine S, Hugouvieux V, Bourguignon J, Forestier C, Vavasseur A, Leonhardt N. microarray analysis of the early response of *Arabidopsis thaliana* roots revealed a regulation of the sulfur and glutathione. Congress of environmental nuclear toxicology, Auteuil, France, 06-08 December 2005.

Azri W, Mai J, Herbette S, Ben Rejeb I, Ammar S, Julien JL, Roeckel-Drevet P. Proteomic analysis of graviperception in poplar. XV Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Lyon, France, 17-21 July 2006.

- Azri W, Ben Rejeb I, Mai J, Herbette S, Ammar S, Julien JL, Drevet P. Proteome analysis of poplar stem under gravitational stimulation. [Poster]. Congress of the French Society of Electrophoresis and Proteomics; St Malo (FRA), 2006.
- Mai J, Herbette S, Julien JL, Ameglio T, Roeckel-Drevet P. Etude de la tolérance au froid chez *Hevea brasiliensis*. XXXIII Forum des Jeunes Chercheurs, SFBBM (Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire), Génomique Fonctionnelle et Métabolisme Cellulaire, Clermont-Ferrand, 5-6 septembre 2006.
- Mai J, Herbette S, Julien JL, Cavaloc E, Ameglio T, Drevet P. Study of the chilling tolerance in *Hevea brasiliensis*. International Natural Rubber Conference, Annual meeting (IRRDB); Siem Reap, KHM, 2007
- Barigah TS, Cochard H, Huc R, Ducrey M, Herbette S. Diversité intra-spécifique des caractéristiques hydrauliques du hêtre. Atelier recherche et gestion forestières, Forêts mélangées; Champenoux, France, 2007.
- Mai J, Herbette S, Julien JL, Cavaloc E, Ameglio T, Drevet P. Chilling resistance in *Hevea brasiliensis*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB); Tampere, Finlande, 2008.
- Barigah TS, Huc R, Ducrey M, Cochard H, Herbette S. Variability in xylem cavitation vulnerability within *Fagus sylvatica* tree species along altitudinal and geographic gradients in France. The 8th IUFRO International Beech Symposium; Hokkaido, Japan, 2009.
- Mai J, Herbette S, Julien JL, Cavaloc E, Améglio T, Drevet P. Evaluation of chilling resistance for main commercial rubber clones. In IRRDB International Natural Rubber Conference and Annual Meetings, Siem Reap, Cambodge, 2009.
- Wortemann R, Herbette S, Ducousso A, Alia R, Gomory D, Drevet-Roeckel P, Cochard H. Variability of vulnerability to xylem cavitation in European beech provenances. International Beech Symposium, Varazdin, Croatie, Octobre 2010.

IV Synthèse des travaux scientifiques

Depuis la thèse, l'ensemble de mes activités de recherche a porté et porte sur les mécanismes de réponse des végétaux aux contraintes environnementales. J'ai été amené à développer des approches variées sur différents modèles végétaux et contraintes environnementales. Mes travaux de thèse ont porté sur la recherche du rôle de gènes supposés antioxydants, les glutathion peroxydases, dans la réponse aux stress chez 2 espèces d'intérêt agronomiques : la tomate et le tournesol. Lors de mon stage post-doctoral, une analyse du transcriptome complet de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence les voies métaboliques impliquées dans la réponse à une exposition au cadmium. Depuis mon recrutement en tant que maître de conférences, j'ai été amené à développer des approches permettant de retrouver les déterminismes de réponse des arbres à des contraintes environnementales. L'essentiel de mes efforts est focalisé sur la recherche des déterminismes de résistance à la cavitation du xylème, un processus perturbant l'alimentation hydrique de l'arbre lors d'une sécheresse.

Les bilans de ces 3 périodes d'activités de recherche seront successivement présentés ci-après.

IV.1 Résumé des travaux de la thèse de doctorat.

Ma thèse s'est déroulée dans l'équipe « Contraintes mécaniques et activités des zones en croissance » du laboratoire PIAF (UMR-547 INRA–Université Blaise Pascal) sous la direction du Pr. Patricia Roeckel-Drevet. Un des axes de recherche de cette équipe était la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des végétaux à des contraintes mécaniques. Ainsi, il a été montré qu'un frottement appliqué à un entre-nœud en croissance de *Lycopersicon esculentum* conduit à l'accumulation des ARNm de deux glutathion peroxydases (Depège *et al.*, 1998). Identifiées comme des enzymes antioxydantes clefs chez les animaux, leur rôle restait méconnu chez les végétaux. Chez les végétaux, ces protéines présentent la particularité d'avoir un résidu cystéine dans le site actif au lieu de la sélénocystéine retrouvée chez les protéines animales et indispensable à leur fonction antioxydante.

Afin de comprendre le rôle de ces protéines chez les végétaux, notamment dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, nous avons entrepris des approches

complémentaires afin d'analyser: 1) la régulation de leur expression en conditions de stress, 2) leur activité enzymatique *in vitro*, 3) leur localisation tissulaire et cellulaire, 4) l'effet d'une sur-expression sur la réponse aux stress de plantes transgéniques.

L'expression de plusieurs GPX, et en particulier de deux GPX de tournesol, *GPXha-1* et *GPXha-2*, est modifiée en réponse à des molécules de signalisation (phytohormones, espèces oxygénées réactives, oxyde nitrique, phosphatase et kinase) et en réponse à des stress abiotiques ou biotiques, par exemple lors d'une infection avec *Plasmopara halstedii* (Herbette et al., 2003). Ces résultats suggèrent un rôle de ces GPX dans la réponse aux stress.

Alors qu'un doute subsistait quant à leur fonction antioxydante, une activité thioredoxine peroxydase (TPX) et une activité GPX ont été mises en évidence *in vitro* pour les protéines GPXle-1 de tomate et GPXha-2 de tournesol (Herbette et al., 2002). La détermination des Vmax et des Km pour ces activités laisse supposer une activité TPX prépondérante *in vivo* pour ces protéines. L'activité enzymatique est alors élucidée pour la première fois.

Pour ces mêmes protéines, nous avons aussi montré une expression tissu-spécifique par immuno-histologie en microscopie optique. Une analyse en immuno-cytologie en microscopie électronique sur un entre-nœud de *L. esculentum* a révélé une localisation de GPXle-1 dans le cytoplasme ou dans l'apoplaste selon le tissu observé (Herbette et al., 2004). De plus, la stimulation mécanique induit des modifications de sa localisation cellulaire, avec une stimulation de son expression dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent plusieurs fonctions pour la protéine GPXle-1.

Enfin, des plantes transgéniques surexprimant une GPX ont été produites et analysées. Nous avons obtenu des tomates exprimant *GPX5* de *Mus musculus* qui est une GPX de type séléno-indépendante, comme le sont les GPX végétales. Des modifications d'accumulation de protéines impliquées dans la transduction de signaux et intervenant dans le cycle de Calvin sont observées chez ces transformants par électrophorèse bidimensionnelle. De plus, la surexpression de *GPX5* augmente la tolérance des tomates transgéniques à des stress abiotiques tels qu'une exposition au froid (Herbette et al., 2005) et une stimulation mécanique (Herbette et al., 2011), alors que ces mêmes plantes sont plus sensibles à l'attaque de pathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *Oidium neolycopersici*. (Herbette et al., 2011)

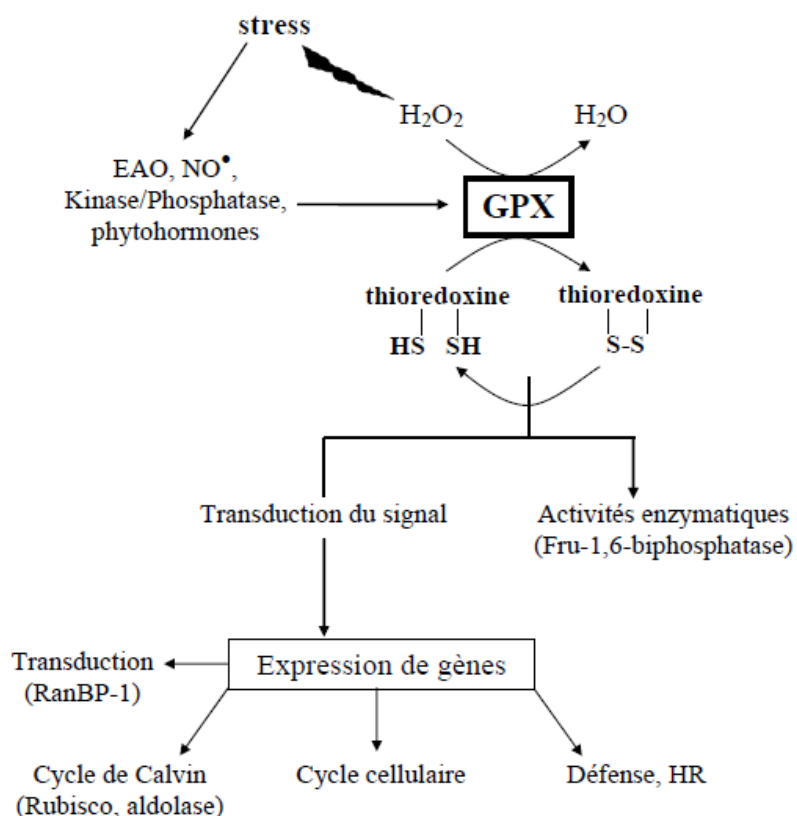


Figure 1 : Schéma proposant un rôle des GPX dans la réponse au stress, à partir des résultats issus des travaux de thèse.

Production scientifique

- 6 articles dans des revues scientifiques à comité de lecture.
- 7 communications scientifiques (orales et par affiches).

IV.2 Résumé de l'activité du stage post-doctoral.

J'ai réalisé mon stage post doctoral au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) de St Paul-Lez-Durance (13), au sein du Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation (LEMS). Le sujet, sous la direction du Dr Nathalie Leonhardt, consistait à analyser le transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une exposition au Cadmium. Cette étude a été menée sur les racines et sur les feuilles, à différentes concentrations de Cadmium et pour différents temps d'exposition. Les analyses des profils de réponse ont démontré l'existence d'un réseau de régulation qui module différenciellement l'expression des gènes de façon tissu- et cinétique-spécifique en réponse au cadmium (Herbette et al., 2006).

En plus des gènes classiquement connus pour être impliqués dans la réponse au stress et au cadmium, l'une des principales réponses observée dans les racines est la régulation

coordonnée de métabolismes utilisant le soufre (Figure 2). Ainsi, l'exposition au cadmium induit une activation du transport, de l'assimilation et du métabolisme du soufre, et de la synthèse du glutathion et des phytochélatines, et une répression de la voie des glucosinolates (consommateurs de soufre). En outre, l'analyse HPLC du Glutathion (GSH) et des phytochélatines (PC, synthétisées à partir du GSH) montre une baisse passagère de GSH après 2 et 6 h du traitement des métaux dans les racines corrélée avec une augmentation des PC. L'ensemble de ces observations suggère que, pour faire face à une accumulation de cadmium, les voies d'assimilation du soufre sont activées en augmentant la transcription des gènes liés dans le but d'assurer l'approvisionnement en GSH pour la biosynthèse de PC. Ces phytochélatines sont connues pour se fixer au cadmium permettant de l'inactiver puis de le séquestrer dans la vacuole.

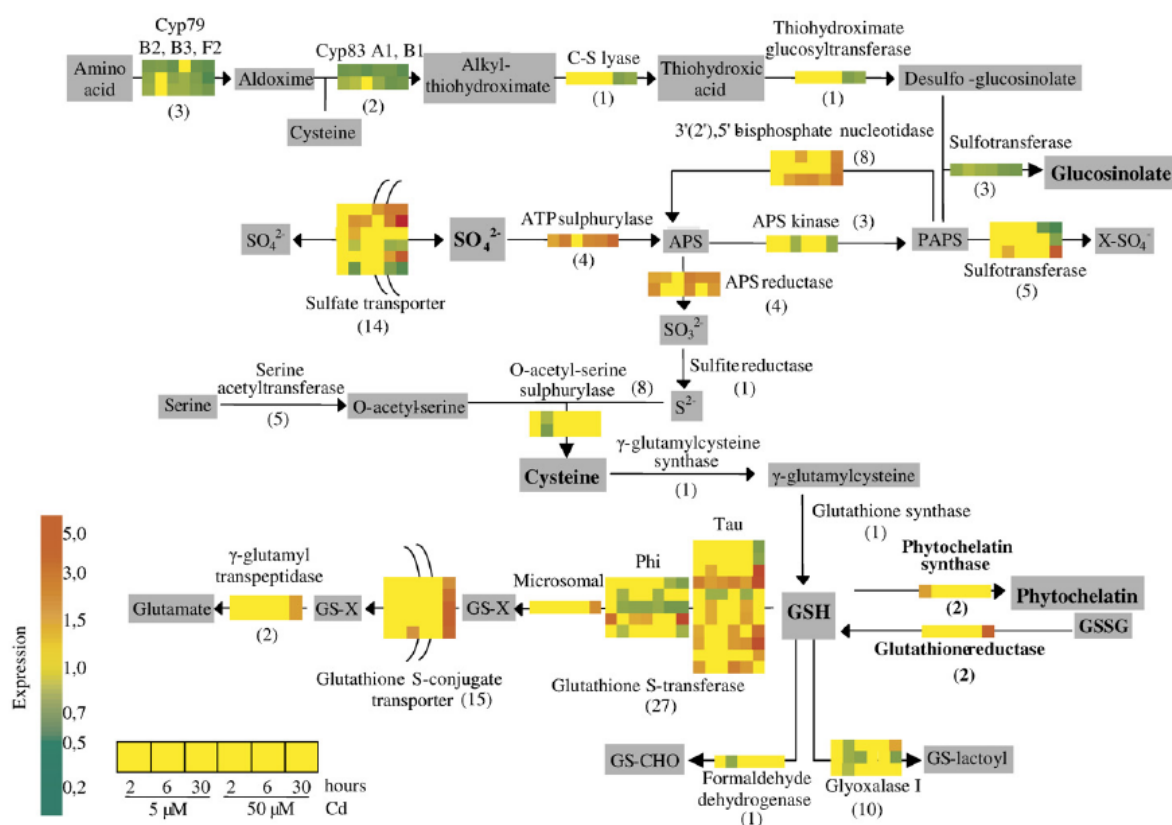


Figure 2 : Profils d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre et de GSH dans les racines. Les métabolites sont représentés dans les cases grises, les flèches représentent les réactions enzymatiques, les noms des enzymes sont donnés sous ou au-dessus des barres de couleur et le nombre d'isoformes est donné entre parenthèses. Les barres de couleur sur les flèches indiquent les niveaux d'expression des gènes modifiés pour les différents traitements au cadmium, et chaque ligne de couleur représente une isoforme.

Dans les feuilles, une induction rapide de gènes codant pour plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes a été observée. Ces résultats apportent de nouvelles perspectives de recherche sur les mécanismes moléculaires de réponse des plantes à l'exposition au cadmium.

Production scientifique

- 1 article dans une revue scientifique à comité de lecture.
- 2 communications scientifiques (orale et par affiche).

IV.3 Travaux de recherche sur l'arbre.

En Septembre 2005, j'ai été recruté comme maître de conférences au sein de l'UMR-547, INRA-Université Blaise Pascal, PIAF (Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier ». Les recherches de cette unité portent sur la physiologie intégrée de l'arbre, en prenant en compte les aspects architecturaux (acquisition de la forme) et les aspects fonctionnels, et en travaillant sur l'ensemble du cycle annuel. Les échelles de travail s'étendent de la molécule à l'arbre entier, en passant par la cellule et l'organe. Lors de mon recrutement, j'ai intégré l'équipe MECA (Contraintes mécaniques et activité des zones en croissance). J'ai participé aux travaux du Pr. Patricia Roeckel-Drevet portant sur l'identification des gènes impliqués dans les événements précoces des déformations et des inclinaisons induites par la gravité chez le peuplier. Parallèlement, j'ai participé aux travaux conduits par le Pr. Patricia Roeckel-Drevet et le Dr. Thierry Améglio sur une étude comparative de la tolérance au froid de différents clones d'hévéa, avec des approches écophysiologiques et moléculaires. Pour ces 2 études, j'ai contribué à tester le rôle du système antioxydant, par des études d'expression géniques ou des dosages biochimiques.

Pour répondre à une volonté de développer des thématiques de recherche de biologie intégrative sur la réponse des arbres aux facteurs abiotiques, l'UMR 547-PIAF a procédé à sa réorganisation pour le quadriennal 2008-2011. L'équipe de recherche HYDRO (architecture hydraulique et résistance à la sécheresse des arbres, tableau 1) a alors été créée en tenant compte des compétences des Drs Hervé Cochard et Tété Barigah sur le fonctionnement hydraulique de l'arbre qui contribuent à la reconnaissance internationale de l'unité dans ce domaine de recherche. L'équipe a été conçue en associant ces compétences en écophysiologie du fonctionnement hydraulique aux compétences en physiologie moléculaire des Drs Aurélie Gousset, Jean-Stephane Venisse et de moi-même, puis aux compétences en écologie moléculaire du Dr. Boris Fumanal. Les recherches de l'équipe HYDRO portent sur les déterminants physiologiques et génétiques de l'architecture hydraulique des arbres et les implications sur leur croissance et leur résistance à la sécheresse. J'ai décidé de rejoindre cette nouvelle équipe pour élaborer, pour la première fois, une approche moléculaire afin de comprendre les mécanismes sous-jacents aux propriétés hydrauliques du xylème, en

particulier la vulnérabilité à la cavitation (VC). Depuis, l'essentiel de mes efforts porte sur cette thématique.

Ces 3 activités de recherche seront successivement présentées ci-après.

EQUIPES DE RECHERCHE			
Architecture et Microclimat - AMi -	Biologie Hivernale Des ligneux - BioDHiv-	Hydraulique et résistance à la sécheresse des arbres - HYDRO -	Contraintes MECAniques et activité des zones en croissance - MECA -
<u>*BALANDIER P. (CR)</u> SAUDREAU M. (CR) ADAM B. (IE) DONES N. (IE) VANDAME M. (AI) MARQUIER A. (TR) WALSER P. (TR) ADILI B. (Thèse) LECA A. (Thèse)	<u>LACOINTE A. (CR)</u> AMEGLIO T. (DR) BEAUJARD F. (CR) GUILLIOT A. (MC) PETEL G. (PR) BONHOMME M. (IR) BRUNEL N. (IE UBP) BODET C. (AI) FAURE A. (AT) SERRE C. (TR) CHARRIER G. (Thèse) THITITHANAKUL S. (Thèse) DECOURTEIX M. (Post-Doc) DUSOTOIT A. (Post-Doc BI**) KASUGA J. (Post-Doc) SATHORNKICH J. (Post-Doc)	<u>COCHARD H. (DR)</u> FUMANAL B. (MC) GOUSSET A. (MC) HERBETTE S. (MC) VENISSE J.S. (MC) BARIGAH T. (IE) BODET C. (AI) CONCHON P. (TR) SERRE C. (TR) AWAD H. M. (Thèse) BEN BAAZIZ K. (Thèse) LAMY J.B. (Thèse) LOPEZ D. (Thèse) SIMOES F. (Thèse) WORTEMANN R. (Thèse)	<u>MOULIA B. (DR)</u> BADEL E. (CR) COUTAND C. (CR) DREVET-ROECKEL P. (PR) FOURNIER-LEBLANC N. (MC) JULIEN J.L. (PR) LENNE C. (MC) FRANCHEL J. (IE UBP) PLOQUIN S. (TR) BASTIEN R. (ASC) DER LOUGHIAN C. (Thèse) GOURCILLEAU D. (Thèse) POT G. (Thèse)

Tableau 1 : Composition des 4 équipes de recherches de l'UMR 547-PIAF au 30 Juin 2010. Les noms des responsables d'équipes sont soulignés.

IV.3.1 Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier.

Ces travaux sont sous la direction du Pr. Patricia Roeckel-Drevet. Le doctorant W. Azri a mené une thèse afin de développer des approches permettant d'identifier des gènes impliqués dans les événements précoces d'une stimulation gravitationnelle, et j'ai participé à l'encadrement de cette thèse. Le redressement du peuplier suite à une modification gravitationnelle implique un processus de courbure locale lié à une élongation différentielle dans les zones en croissance primaire et un processus de courbure lié à la différenciation du bois de réaction dans les zones en croissance secondaire. Ces modifications morphogénétiques ont été détectées respectivement dans les parties apicale et basale de la tige de peuplier inclinée. Une analyse protéomique menée par électrophorèse bidimensionnelle couplée à une analyse d'expression par PCR quantitative a permis d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée par cette stimulation gravitationnelle dans les 2 zones de réponses. Deux thioredoxines, protéines antioxydantes, ont été identifiées et des études

complémentaires ont permis de montrer quelles étaient localisées au niveau des amyloplast, des organites impliqués dans la perception de la gravité au niveau du parenchyme cortical. Il ressort également de cette étude que les événements moléculaires conduisant à la réorientation de la tige sont différents selon la zone de réponse considérée.

Production scientifique

- 1 article dans une revue scientifique à comité de lecture.
- 3 communications scientifiques (orales et par affiche).

IV.3.2 Etude de la tolérance au froid de l'hévéa.

En collaboration avec la manufacture MICHELIN, une analyse de la tolérance au froid chez *Hevea brasiliensis* a été réalisée. J'ai été chargé de participer aux travaux de la thèse de Jing Mai sur cette thématique dirigée par le Pr. Patricia Roeckel-Drevet et le Dr. Thierry Améglio. La production de latex liée à l'hévéaculture est confrontée à des mutations socio-économiques. La demande croissante en caoutchouc naturel et la pénurie de terrain disponibles due à la concurrence avec d'autres cultures ont conduit l'hévéaculture à s'étendre dans des régions sub-optimales, plus sèches et plus froides. Dans ces régions, l'hévéa est affecté par des maladies liées aux températures basses non gélives « chilling injury » qui se manifestent le plus souvent à des températures inférieures à 12 °C. Outre les dégâts occasionnés par les températures les plus basses, la production de latex chute durant la période froide. Cette chute pourrait être diminuée en utilisant des cultivars mieux adaptés à ces températures. Dans le cadre d'une collaboration entre la manufacture MICHELIN et l'UMR PIAF, nous élaborons et adaptons à l'hévéa des méthodes de sélection pour la tolérance au froid. La première partie de cette recherche a consisté à étudier l'effet du froid sur la photosynthèse et le système antioxydant chez un clone d'hévéa (Mai et al., 2009). Une étude de la cinétique de réponse à un traitement à 10 °C nous a permis de mieux comprendre cette réponse au froid chez cette espèce. Les étapes clés et les paramètres d'évaluation ainsi déterminés ont été utilisés dans la deuxième partie de cette recherche portant sur 8 clones d'hévéa d'intérêt agronomique. Cette étude a permis d'identifier des éléments pour l'évaluation de la tolérance au froid et une classification des clones selon leur degré de sensibilité au froid a été proposée (Mai et al., 2010). Ainsi RRIM 600 est le clone le plus tolérant aux basses températures, alors que les clones IRCA 317, PB260, PB217 et PR107 sont les plus sensibles. GT1, YunYan77-4 et IRCA707 ont un niveau de tolérance intermédiaire. De l'ensemble des résultats obtenus sur la cinétique au froid de ces 8 clones, il ressort que la tolérance au froid chez l'hévéa est liée à une meilleure capacité

photosynthétique et une meilleure coopération des enzymes antioxydantes, notamment de la superoxyde dismutase (SOD).

Production scientifique

- 2 articles dans des revues scientifiques à comité de lecture.
- 7 communications scientifiques (orales et par affiches).

IV.3.3 Activités de recherche sur l'hydraulique des arbres.

IV.3.3.1 Contexte des recherches.

L'état hydrique d'un arbre est un paramètre clé de sa physiologie. Il détermine, directement ou indirectement, les échanges de matière avec son milieu, sa croissance et sa survie dans des conditions extrêmes. Depuis des décennies, comprendre et modéliser l'état hydrique des plantes est un défi majeur pour la recherche et l'unité contribue à ces recherches depuis sa création dans les années 80. L'objectif scientifique de l'équipe HYDRO est d'assurer l'étude des bases biophysiques et moléculaires du fonctionnement hydraulique des arbres, et d'en analyser les conséquences sur le fonctionnement hydrique, les échanges gazeux et la croissance. Parmi les processus étudiés dans cette équipe, nous nous intéressons à la vulnérabilité à la cavitation (VC) des vaisseaux du xylème.

Les modifications climatiques annoncées vont avoir un impact certain sur l'état hydrique des arbres, pouvant conduire à leur mort, en particulier en cas d'accentuation des épisodes de sécheresse extrêmes. Des recherches sont donc nécessaires pour comprendre les processus clés qui peuvent permettre aux arbres de surmonter ces sécheresses extrêmes. L'identification de géotypes qui peuvent survivre à de graves sécheresses est également essentielle pour soutenir la production forestière. La résistance à la sécheresse des arbres est conférée par de nombreux traits physiologiques liés à la tolérance à la dessiccation (par exemple, le maintien de la turgescence des cellules grâce à des ajustements osmotiques ou de l'élasticité de la paroi cellulaire), ou l'évitement (tels que les changements de la conductance stomatique, la surface foliaire, et l'orientation des feuilles) (Chaves et al., 2003). Cependant, la caractérisation de ces caractères est très compliquée car ils ne sont révélés que lorsque les plantes sont expérimentalement exposées à des sécheresses prolongées. Il n'est donc pas envisageable d'explorer la variation de ces caractères à travers un grand nombre de géotypes d'arbres. L'identification sur un caractère intrinsèque et opérationnel lié à la résistance à la sécheresse des arbres est donc nécessaire. Il y a maintenant un nombre croissant de preuves que la VC du xylème répond à ces critères.

La transpiration est la force motrice pour le transport de l'eau, et selon la théorie de « tension-cohésion » (Angeles et al., 2004, Cochard et al., 2001), elle tire l'eau du sol vers les feuilles le long d'un continuum de potentiels hydriques (ψ) décroissants. La pression dans les vaisseaux du xylème dépend des potentiels hydriques du sol et de l'atmosphère, et elle peut être très négative (tension typiquement de -1 MPa à -3 MPa) et donc dans un état physique métastable. Lorsque la teneur en eau du sol diminue au cours d'une sécheresse, cette tension est exacerbée. L'arbre peut contrôler cette tension en limitant les pertes d'eau par la fermeture des stomates. Cependant, au cours d'une sécheresse extrême, la tension de la sève peut dépasser une valeur seuil et rompre la colonne d'eau dans les vaisseaux du xylème (c'est le processus de cavitation). Les vaisseaux remplis d'air sont alors embolisés et deviennent non fonctionnels. L'alimentation hydrique des parties supérieures de l'arbre n'est alors plus assurée, affectant le métabolisme cellulaire, puis entraînant une mortalité prématurée des racines ou des rameaux et finalement la mort de l'arbre. Les espèces ou génotypes résilients à la sécheresse doivent pouvoir maintenir des vaisseaux du xylème fonctionnels afin de maintenir les tissus irrigués, en évitant le processus de cavitation de ces vaisseaux.

De fortes corrélations existent entre la VC du xylème et la distribution des espèces vis-à-vis de la disponibilité en eau (Kavanagh *et al.* 1999, Maherali *et al.* 2004, Tissier *et al.* 2004). La figure 3 illustre cette corrélation analysée pour la plupart des espèces ligneuses de la flore française (Cochard, non publié). Les espèces résistantes à la sécheresse sont donc intrinsèquement moins vulnérables à la cavitation du xylème que les espèces sensibles à la sécheresse.

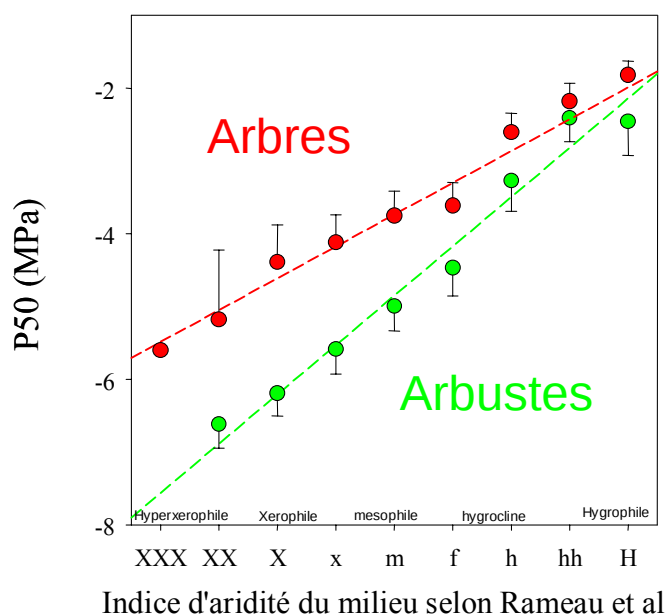


Figure 3: Relation entre la VC d'espèces ligneuses et l'indice d'aridité de leur aire optimale. La VC est estimée par la pression de la sève induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (P50). Plus cette valeur est négative et plus l'espèce sera résistante à la cavitation. L'indice d'aridité établi par Rameau *et al.* (Flore Forestière Française, Tomes 1-3, IDF eds) est un index empirique relié à l'écologie de l'espèce. Cet index varie de H, pour les espèces les plus hydrophiles, à XXX, pour les espèces les plus xérophiles. La corrélation est faite pour une soixantaine d'espèces ligneuses de la flore française (Cochard *et al.*, non publié).

La VC apparaît comme un paramètre clé de la résistance des arbres à une sécheresse extrême et comme un critère prometteur pour la sélection de génotypes résistants à cette contrainte. Toutefois, les études de ce caractère à l'échelle intra-spécifique étaient assez rares. La valeur adaptative de ce caractère reste méconnue. Deux difficultés principales peuvent expliquer cette lacune surprenante. Premièrement, une méthode d'évaluation de l'embolie du xylème sur un grand nombre de spécimens faisait défaut jusqu'au développement récent du « Cavitron » par l'unité (Cochard 2002; Cochard et al 2005), un appareil utilisant la force centrifuge pour rapidement caractériser la VC d'un échantillon. Deuxièmement, la base génétique de la résistance à l'embolie reste totalement inconnue. Nous nous sommes d'abord attachés à caractériser la vulnérabilité à l'échelle intra-spécifique, puis nous avons commencé à appréhender les bases moléculaires de ce caractère.

IV.3.3.2 Variabilité de la VC à l'échelle intra-spécifique

Nous avons décidé de mener cette étude sur le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) pour 2 raisons, l'une stratégique et l'autre scientifique. Pour le quadriennal 2008-2011, l'unité souhaitait voir se développer des thématiques abordant la variabilité fonctionnelle sur la forêt de moyenne montagne, écosystème forestier de la région le plus répandu où le hêtre est l'espèce dominante. De plus, cette espèce présente une large répartition géographique et une large amplitude écologique, maximisant les chances d'observer de la variabilité intra-spécifique. Le hêtre présente aussi l'avantage d'être une espèce qui peut être analysée par le Cavitron, ce qui n'est pas le cas de toutes les espèces (Cochard et al., 2010).

Dans un premier temps, nous avons analysé la variabilité à l'échelle de l'arbre et sur des populations *in situ*. A l'échelle de l'arbre, la VC est fortement influencée par l'exposition lumineuse (Cochard et al., 1999 ; Herbette et al., 2010). Par contre, la VC se montre relativement stable dans le temps, puisqu'elle ne varie que légèrement au cours de l'année et que des échantillons peuvent être conservés au moins 10 semaines au froid sans affecter la VC (Herbette et al., 2010). La VC étant une propriété intrinsèque au xylème, elle serait conditionnée lors de la mise en place du bois. La relative stabilité de ce paramètre rend possible des études à grande échelle impliquant un échantillonnage important. Une variabilité de la VC a ainsi été mise en évidence tant à l'intérieur d'une population qu'entre différentes populations *in situ* de hêtres. Des différences substantielles de VC peuvent être mises en évidence sur des gradients latitudinaux (Figure 4) ou altitudinaux à l'échelle de la France (Herbette et al., 2010).

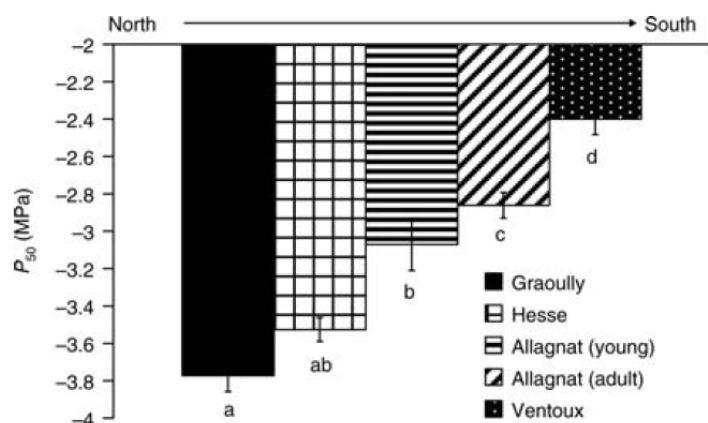


Figure 4 : La VC de populations de hêtre distribuées le long d'un gradient latitudinal. Les valeurs de P₅₀ ont été déterminées pour des arbres échantillonnés dans les sites forestiers de Graouilly (57), Hesse (57), Allagnat (63) et du Mont Ventoux (84). Une flèche indique la répartition des populations selon un axe nord-sud. Pour le site d'Allagnat, les valeurs de P₅₀ ont été déterminées distinctement sur des arbres jeunes et adultes. Les données sont des moyennes ($\pm$ ES) de 8 à 50 échantillons. Les données avec des lettres différentes sont significativement différentes avec $P < 0,05$.

Les populations naturelles d'arbres sont donc constituées par l'assemblage de phénotypes variés pour la VC avec une variabilité contrastée selon les populations. La variabilité de ce caractère hydraulique observée entre individus ou entre populations peut être due à une plasticité phénotypique et/ou une variabilité génétique. Des études récentes de l'unité ont montré des différences dans la vulnérabilité à la cavitation entre des clones chez plusieurs espèces telles que les pruniers (Cochard et al., 2008), le peuplier et le saule (Cochard et al., 2007). Cependant, il n'existe aucune donnée sur la variabilité génétique de la cavitation chez des populations naturelles. Dans le cadre de la thèse de Rémi Wortemann, la variabilité génétique de la VC a été explorée chez des provenances internationales de hêtres regroupées dans des plantations comparatives, de façon à minimiser la plasticité phénotypique liée aux différences de conditions climatiques entre sites. Ces provenances ont été choisies pour couvrir largement l'aire de répartition naturelle du hêtre. De façon générale, ces dispositifs nous montrent que la variabilité à l'intérieur d'une provenance est grande alors que les différences moyennes entre provenances sont faibles (Figure 5). Il n'y a donc pas de différences génétiques significatives entre ces provenances internationales. Les dispositifs de plantation décrits ci-dessus ayant été implantés dans des zones climatiques contrastées, nous avons mis en évidence une plasticité phénotypique importante pour chacune des provenances de Hêtre (Figure 5).

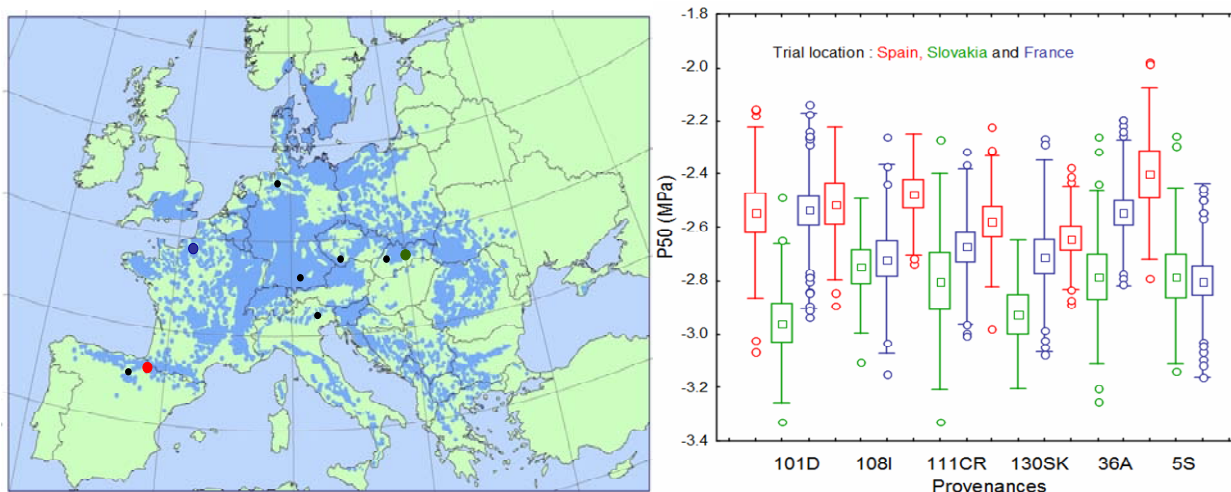


Figure 5 : Variabilité génétique et plasticité phénotypique de la VC chez des provenances internationales de hêtres. La carte montre les sites d'origine des provenances analysées (petits points noirs) et les lieux des plantations comparatives où elles ont été cultivées (points colorés : France, Espagne et Slovaquie). Le graphique présente les valeurs de P50 obtenues pour les 6 provenances analysées : 101D, Allemagne ; 108I, Italie ; 111CR, République Tchèque, 130SK, Slovaquie ; 36A, Allemagne ; 5S, Espagne, et sur les 3 plantations comparatives (chaque couleur représentant une plantation). Petit carré : moyenne ; grand rectangle : erreurs standards ; barres : écart-types, cercle : données extrêmes.

Il reste à identifier les facteurs environnementaux pouvant expliquer cette plasticité phénotypique. La teneur en eau du sol est logiquement proposée pour expliquer des différences entre populations localisées sur des sites contrastés pour la disponibilité en eau, mais cette hypothèse restait à prouver. Dans le cadre de la thèse de Hosam Awad, une plasticité phénotypique a été démontrée chez des peupliers cultivés en conditions contrôlées (Awad et al., 2010). Ainsi, une acclimation forte de sa VC s'opère lorsqu'on module les conditions hydriques du sol, et les arbres sont d'autant moins vulnérables à la cavitation que la teneur en eau du sol est basse (Figure 6). Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres clones de peupliers (Fichot et al., 2010). Un autre critère de la VC, la valeur de tension du xylème au cours de laquelle la cavitation commence (P12), est corrélée avec la plus faible valeur du potentiel hydrique foliaire subie par l'arbre; la différence constante entre les deux paramètres (environ 0,5 MPa) constitue une marge de sécurité. De tels résultats soutiennent l'hypothèse que la VC est un caractère essentiel pour la résistance à la sécheresse.

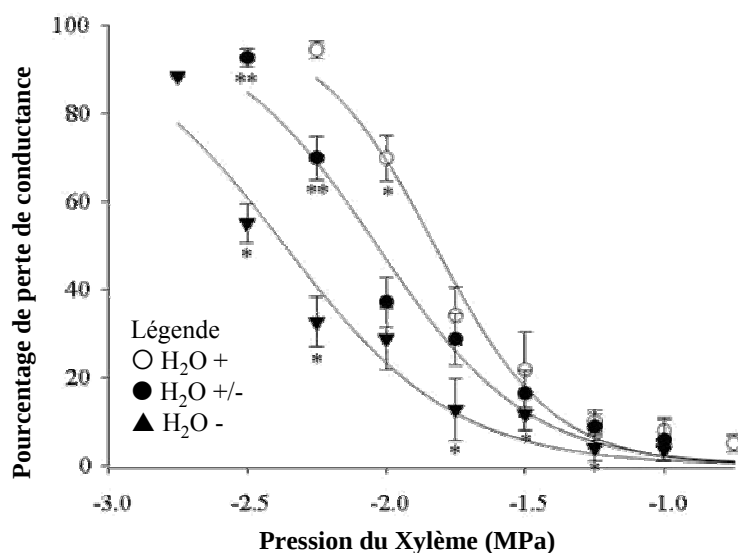


Figure 6 : Courbes de VC de tiges de peupliers (*Populus tremula x alba*) cultivés sous différents régimes hydriques. Le pourcentage de perte de la conductance hydraulique du xylème en fonction de la baisse de potentiel hydrique du xylème est représenté pour des plants bien arrosés (cercles ouverts), des plants modérément arrosés (cercles pleins) et des plants peu arrosés (triangles pleins). Chaque ensemble de données représente la moyenne ($\pm$ ES) de huit échantillons. Les lignes représentent un ajustement des points de données selon l'équation de Pammenter et Van Der Willigen (1998). Les données qui sont significativement différentes entre les traitements ont des symboles différents (*, **).

IV.3.3.3 Déterminismes moléculaires de la VC.

Le mécanisme du processus de cavitation est bien admis dans la littérature (Cochard, 2006). La cavitation d'un vaisseau du xylème surviendrait par le passage d'une bulle d'air d'un vaisseau ou une cellule embolisé(e) à un vaisseau rempli de sève. Ce passage se ferait par les ponctuations qui sont des zones du vaisseau dépourvues de paroi secondaire, et elles sont donc constituées de paroi pecto-cellulosique ayant subi des modifications (Figure 7). Elles sont conçues pour permettre à l'eau de circuler entre les vaisseaux, mais elles sont aussi une voie d'entrée de l'air dans la sève brute sous tension (Sperry 1986, Tyree et Sperry 1989, Cochard et al. 1992, Jarbeau et al. 1995). Quand un vaisseau du xylème embolisé est adjacent à un vaisseau fonctionnel contenant de la sève sous tension, une différence de pression se développe à travers la paroi des ponctuations connectant les 2 vaisseaux. Au-dessus d'une différence de pression critique, l'air pénètre à travers la membrane de la ponctuation et se répand dans le vaisseau rempli de sève (Figure 7). On peut raisonnablement penser que les bases moléculaires de la VC du xylème sont liées aux propriétés biochimiques, structurales et physiques de la paroi pecto-cellulosique des ponctuations.

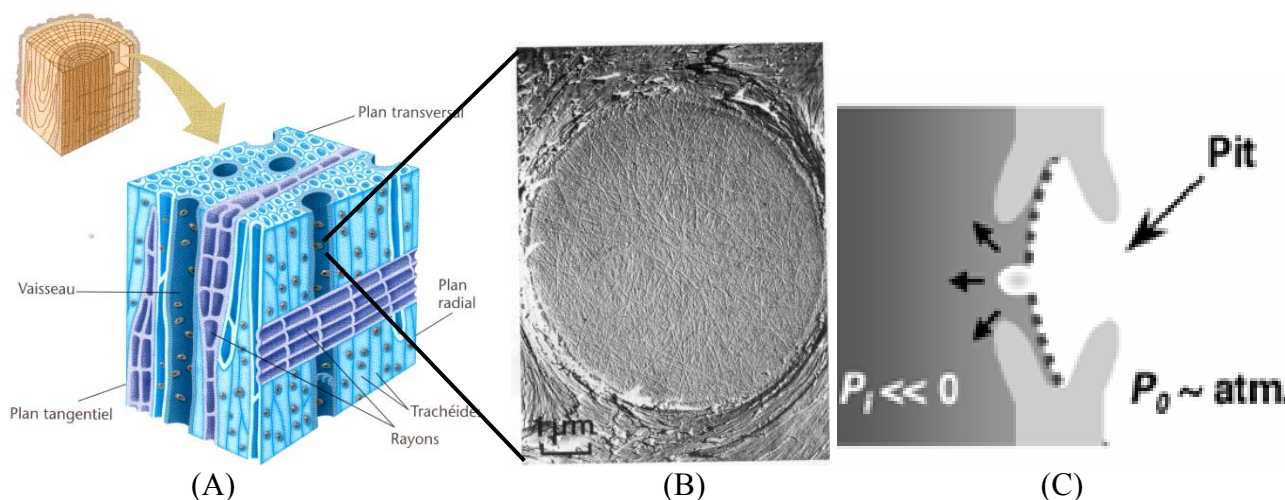


Figure 7 : Système vasculaire des arbres angiospermes (A). Les cellules des fibres et vaisseaux sont allongées dans la direction longitudinale pour permettre le transport de l'eau des racines aux feuilles. Les raccords hydrauliques entre voisins sont assurés par les ponctuations. Leurs parois observées au MEB (B), de 10 µm de diamètre, sont perméables à l'eau mais étanches à l'air. La cavitation, selon l'hypothèse du « germe d'air », se produit quand une petite bulle d'air traverse la structure de la paroi d'un vaisseau vide à un vaisseau fonctionnel dans lequel la pression est négative (C).

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à avoir une connaissance précise du mécanisme de formation de la cavitation de façon à identifier les structures clés du processus et ainsi les gènes correspondants. En manipulant la tension de surface de la sève, nous avons démontré expérimentalement (Cochard et al., 2009) que le processus de cavitation serait lié à une rupture capillaire d'un ménisque air-eau, et non pas au déplacement ou à la rupture de la paroi de la ponctuation comme précédemment supposé.

En modulant la composition ionique de la sève, il est possible de faire varier la conductance hydraulique du xylème (van Ieperen et al., 2000). Cet effet serait lié à des variations de la porosité des ponctuations par gonflement des pectines (Zwieniecki et al., 2001). Nous avons bien aussi observé cette variation de la conductance hydraulique chez plusieurs espèces, mais l'effet est resté très marginal sur la vulnérabilité à la cavitation (Cochard et al., 2010). Ce résultat suggère donc que la variation de la porosité des ponctuations par gonflement des pectines n'est pas impliquée dans la vulnérabilité à la cavitation.

Les pectines sont restées des cibles de choix dans nos recherches des structures clés de la cavitation, car elles présentent la particularité d'être spécifique de la paroi des ponctuations (les vaisseaux étant recouverts de paroi secondaire). De plus, nous avons récemment démontré un rôle important du calcium des parois dans le mécanisme de cavitation (Herbette et Cochard, 2010). Le calcium forme des ponts entre des chaînes d'homogalacturonanes, des polymères pectiques riches en acide galacturonique ; et nous avons démontré que la chélation (ou précipitation) de ce calcium augmente la VC du vaisseau. Cela a été observé sur de nombreuses espèces d'arbres, tant feuillues que résineuses; ce qui atteste d'une certaine ubiquité du processus de cavitation chez les arbres, et

potentiellement, des gènes responsables de ce mécanisme. Par ailleurs, ce calcium expliquerait l'essentiel de la différence entre espèces pour la VC (Herbette et Cochard, 2010).

Les homogalacturonanes sont synthétisés et sécrétés sous une forme fortement méthylée, et ils sont dé-estérifiés par des pectines méthylesterases (PME) pariétales. Ainsi, ces enzymes influencent la proportion de ponts calciques, et apparaissent donc comme des candidats sérieux dans la recherche des bases génétiques de la VC. Des peupliers sur-exprimant une PME ont été produits par le laboratoire du Dr. Ewa Mellerowicz du « Umea Plant Science Center », et ils montrent une diminution du taux de méthylation des pectines (Siedlecka et al., 2008). Sur ces peupliers nous avons pu aussi révéler une diminution de la VC (Figure 8), ce qui suggère que les PME seraient impliquées dans la VC. Il reste à analyser la structure du xylème et des ponctuations chez ces peupliers, afin d'expliquer cette modification de la VC.

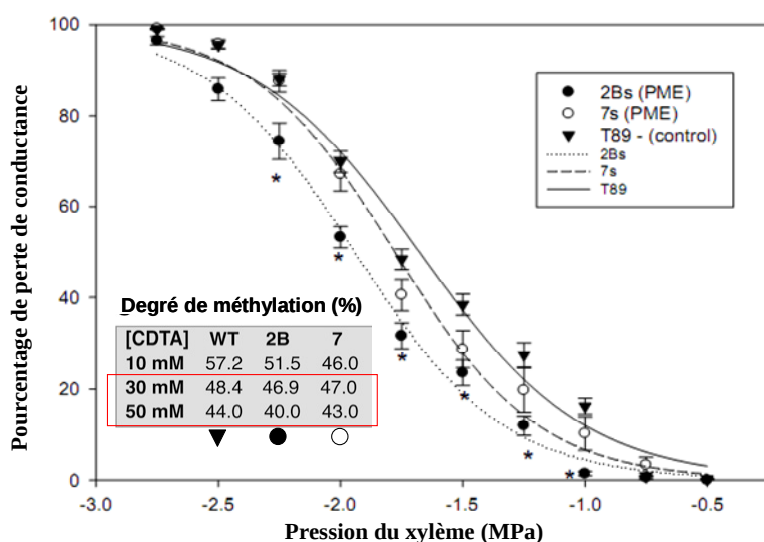


Figure 8 : Courbes de VC de peupliers (*Populus tremula x tremuloides*) sur-exprimant une PME. Le pourcentage de perte de la conductance hydraulique du xylème en fonction de la baisse de potentiel hydrique du xylème est représenté pour des plants non transformés (T89) et des plants surexprimant une PME (2Bs et 7s). Chaque ensemble de données représente la moyenne ($\pm$ ES) de huit échantillons. Les lignes représentent un ajustement des points de données selon l'équation de Pammenter et Van Der Willigen (1998). Les données des lignées PME 2Bs et 7s significativement différentes de la lignée témoin T89 portent un astérisque (*).

IV.4 Bilan des activités de recherche sur l'arbre.

Dès mon recrutement en 2005, j'ai été amené à participer à deux thématiques de recherche portant sur la réponse des arbres à 2 facteurs abiotiques : la gravité et le froid. Bien que les espèces et les facteurs soient différents, l'objectif commun à ces thématiques est de rechercher les déterminismes moléculaires de la réponse, en mettant l'accent sur le métabolisme oxydant. Ainsi, nous avons mis en évidence une participation de la thioredoxine dans les réponses précoces à la gravité chez le peuplier, et nous avons montré que la tolérance au froid chez différents clones d'Hévéa est corrélée à l'efficacité de leur système antioxydant. Les compétences acquises lors de mes activités antérieures (thèse, stage post-doctoral) ont contribué à mettre en œuvre les analyses d'expressions géniques, d'activités enzymatiques antioxydantes et des analyses d'écophysiologie (fluorescence de la chlorophylle, ...). Ma participation aux activités de recherche sur la gravi-

perception a logiquement pris fin après la soutenance de thèse du Dr. Wassim Azri et celle sur la tolérance au froid de l'Hévéa n'est plus une thématique prioritaire de notre partenaire Michelin.

Depuis la création de l'équipe HYDRO, à la fin de l'année 2007, mes activités se sont focalisées sur le fonctionnement hydraulique de l'arbre, plus particulièrement sur la VC. Bien qu'il existe de nombreuses études sur ce caractère clé dans la résistance à la sécheresse des arbres, l'étude des déterminismes moléculaires et génétiques est restée vierge. Les raisons sont probablement historiques et scientifiques. D'une part, ce champ thématique a pour l'essentiel été développé par des écophysiologistes de l'arbre (Drs. Zimmermann, Sperry, Tyree et Cruiziat) et repris ensuite par des cytologistes (Drs. Choat, Jansen et Pittermann) qui ont étudié les bases structurales mais qui n'ont pas trouvé d'intérêts à en rechercher les déterminismes génétiques et moléculaires. La biologie moléculaire sur les ligneux a aussi connu un essor assez récent. D'autre part, les études sur les bases moléculaires et génétiques de la VC restent difficiles car elles ne concernent qu'une petite partie de la paroi et un seul type cellulaire (les vaisseaux) et elles impliquent des compétences et des techniques spécifiques à l'hydraulique. La constitution de l'équipe Hydro a permis de relever ce défi. Les études se sont successivement focalisées sur la variabilité intra-spécifique de la VC (un préalable à la recherche des bases génétiques et moléculaires) et sur les bases moléculaires. Les principales conclusions sur ces études sont :

- 1- La VC est très variable chez des populations naturelles de hêtre ; et une plasticité phénotypique, plus qu'une variabilité génétique, expliquerait la variabilité inter-population. La variabilité génétique à l'intérieur d'une population semble forte.
- 2- La VC est très plastique, et elle s'acclimate à la teneur en eau du sol. Cette observation supporte le rôle de la VC dans la résistance à la sécheresse.
- 3- Le calcium joue un rôle déterminant dans la VC, notamment pour la différence entre les espèces. Les pectines auraient un rôle décisif dans ce caractère; elles feront donc l'objet d'une attention particulière dans la poursuite de nos travaux.

A priori, le choix de développer une thématique de recherche « mono-variable » (la VC) peut paraître très restrictif, mais les lacunes sur les aspects moléculaires de cette variable sont grandes et elles doivent être comblées si l'on veut progresser sur les aspect fonctionnels, tels que la valeur adaptative ou encore les compromis avec d'autres caractères. Ces travaux marquent le début d'une nouvelle étape dans la compréhension du fonctionnement hydrique de l'arbre, et apportent un nouveau regard sur les bases génétiques de la résistance à la sécheresse (classiquement abordées sur les cellules vivantes). Il me paraît donc évident que cette thématique doit être poursuivie et même davantage développée. Les perspectives de recherche qui sont proposées ci-après s'inscrivent donc dans une continuité, au moins à court terme, et impliqueront de nouvelles approches.

Production scientifique

- 7 articles scientifiques dans des revues à comité de lecture.
- 14 communications scientifiques.

V Perspectives de recherche

Les perspectives de recherche qui sont présentées ici concernent à la fois des projets à court terme sur les déterminismes moléculaires et génétiques de la VC et des perspectives à plus long terme sur l'importance fonctionnelle de la VC ou sur l'architecture hydraulique de l'arbre. Les premiers s'inscrivent dans le prochain quadriennal du PIAF et certains seront effectivement mis en œuvre dans le cadre d'un projet ANR Blanc de 4 ans intitulé « Déterminismes biophysiques et moléculaires de la vulnérabilité à l'embolie chez les arbres ». Les secondes sont soit programmées pour le prochain plan quadriennal de l'unité, soient des réflexions et des propositions sur des thèmes à développer sur le fonctionnement hydrique de l'arbre et dans lesquels je pourrais être directement impliqué. Ces perspectives s'inscrivent dans le cadre d'une équipe et reposent sur les compétences de cette équipe ; les noms des personnes impliquées au premier plan seront précisés et soulignés. Dès lors que certaines perspectives apparaissent prioritaires et nécessitent un investissement important, je proposerai qu'elles fassent l'objet d'un sujet de thèse.

V.1 Bases structurales, moléculaires et génétiques de la VC.

Pour identifier les bases structurales, moléculaires et génétiques de la VC, nous avons choisi de mener un ensemble d'actions de recherches complémentaires. La poursuite de cette thématique de recherche s'inscrit dans le projet ANR Blanc intitulé « Déterminismes biophysiques et moléculaires de la vulnérabilité à l'embolie chez les arbres », qui commence en 2011 pour une durée de 4 ans. L'élucidation des bases génétiques implique d'avoir des informations sur les bases structurales et moléculaires. Pour cette raison, nos recherches s'organiseront autour de 2 axes complémentaires : 1) caractérisation des ponctuations et 2) bases génétiques de la VC.

V.1.1 Caractérisation des ponctuations.

Pour identifier les structures anatomiques et les composants clés des ponctuations responsables de la VC, nous mettrons en œuvre diverses approches de microscopie pour analyser la physique et la chimie des ponctuations. Nous tacherons de relier les caractéristiques des

ponctuations avec la VC, aux niveaux inter-spécifiques ou intra-spécifiques. Les comparaisons inter-spécifiques offrent une large gamme de variation de la VC et donc *a priori* des variations importantes de structure des ponctuations. Cependant, la relation entre les 2 caractères peut s'avérer difficile à établir si les structures et les compositions sont trop différentes. La figure 9 illustre très bien cette difficulté. D'après cette figure, on pourrait conclure que les parois des ponctuations sont d'autant plus épaisses que les espèces sont résistantes à la cavitation, mais leurs structures apparaissent suffisamment différentes pour nuancer cette corrélation faite sur cet échantillonnage. A l'opposé, une étude à l'échelle intra-spécifique semble plus facile car elle implique des comparaisons de structures similaires. Dans ce cas, nous serons amenés à considérer l'influence génétique sur la VC (comparaison de génotypes) et l'influence environnementale (comparaison entre des branches d'ombre ou de lumière (Herbette et al., 2010), ou des plants soumis à des régimes hydriques différents (figure 6)).

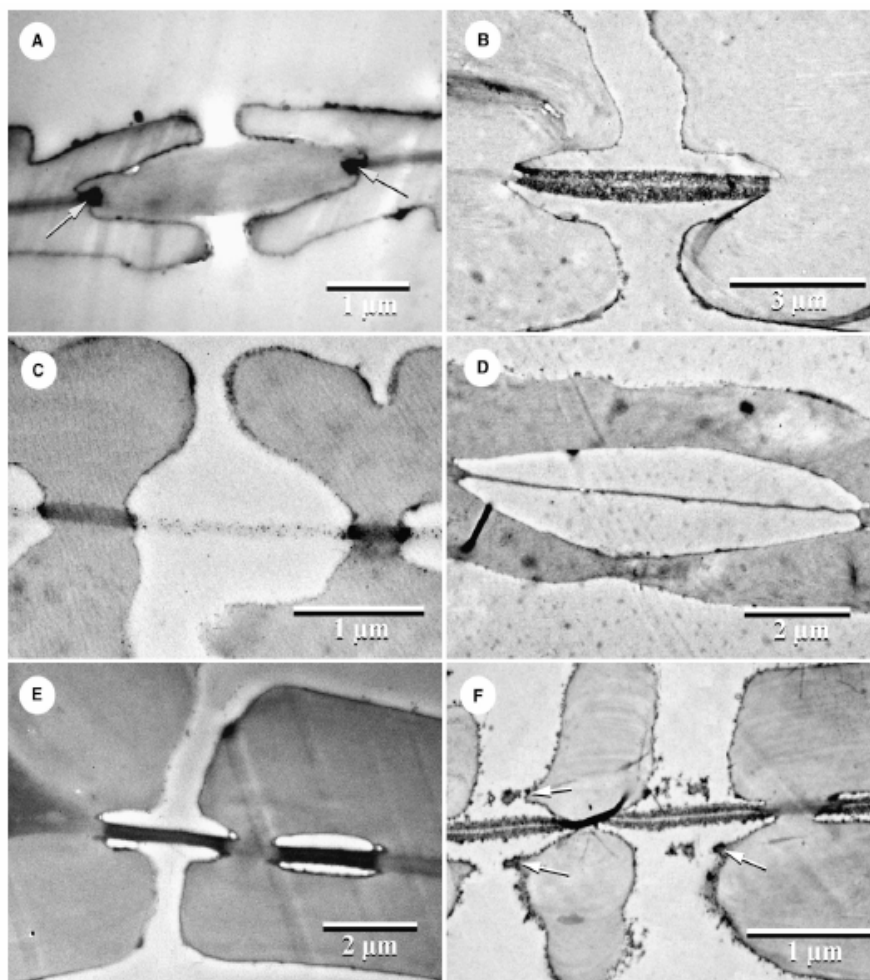


Figure 9 : Ponctuations observées en TEM sur des coupes transversales de bois de différentes espèces Angiospermes. A : *Arbutus urva-ursii*, B : *Laurus nobilis*, C : *Betula ermanii*, D : *Populus fremontii*, E : *Citrus reticulata*, F : *Fraxinus americana*. Extrait de Jansen et al. (2009).

Il existe très peu d'informations dans la littérature sur la relation entre la structure des ponctuations et son implication dans la pénétration de l'air. Choat et al. (2003) ont révélé une faible corrélation entre la porosité de la ponctuation et la VC. Leurs conclusions étaient probablement biaisées par le mode de préparation des échantillons et les techniques d'observation employées. Avec les microscopes électroniques classiques (à transmission ou à balayage), les échantillons doivent être complètement déshydratés; ce qui altère vraisemblablement la structure des ponctuations et notamment des pectines qui forment des gels très hydratés. Un deuxième problème est dû au fait que les ponctuations sont observées dans un état relâché, avec ces mêmes techniques. En raison des pressions négatives importantes exercées sur leur surface, les parois des ponctuations sont étirées lors de la déshydratation (Figure 7c, Figure 10), ce qui augmente leur surface et modifie probablement leur structure. Ainsi, les propriétés mécaniques des ponctuations sont à prendre en compte dans la recherche des déterminants de la VC.



Figure 10 : Ponctuations observées en TEM sur une coupe transversale de vaisseaux du xylème embolisés de *Populus tremula* x *alba*. La paroi de la ponctuation de gauche montre un étirement et celle de droite est accolée à la bordure du vaisseau supérieur.

Le développement de nouvelles techniques de microscopie devrait permettre de révéler la relation entre ponctuations et propriétés hydrauliques. Ainsi, il est possible d'observer des ponctuations hydratées et sous étirement, grâce à la technique de microscopie environnementale (ESEM-FEG). Une alternative est d'observer des échantillons congelés dans un Cryo-SEM. Les échantillons seront soumis à des pressions négatives juste en dessous du point d'apparition de la cavitation par déshydratation, et à une congélation instantanée avec de l'azote liquide. La microscopie à force atomique (AFM) permet aussi d'analyser des échantillons hydratés et non-fixés. L'AFM sera aussi utilisée pour caractériser les propriétés viscoélastiques des ponctuations.

Les données sur la composition biochimique de la paroi des ponctuations sont encore plus rares que celles sur la structure. L'analyse de leur structure montre qu'elle est issue de la lamelle moyenne et de la paroi primaire des cellules à l'origine des vaisseaux ayant subi des modifications

(Figure 11), mais la nature de ces modifications et la composition finale reste méconnue. Nous analyserons la composition de ces parois grâce à des anticorps reconnaissant les caractéristiques structurales de polysaccharides. À l'heure actuelle, les techniques d'immuno-histochimie sont l'un des meilleurs moyens de discerner les aspects microstructuraux de la paroi cellulaire et de localiser précisément les polymères *in situ* dans un tissu complexe. Un panel d'anticorps monoclonaux a été mis au point contre des motifs de pectines, de xyloglucanes, de xylanes et de mannanes; nous les utiliserons.

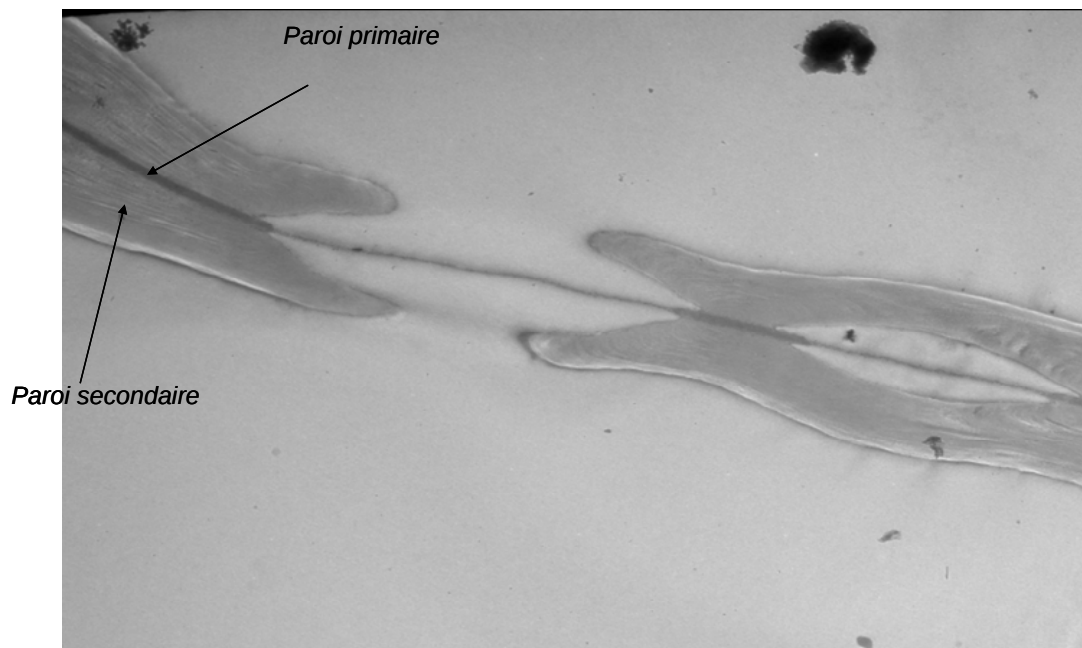


Figure 11 : Ponctuations observées en TEM sur une coupe transversale de vaisseaux du xylème de *Populus tremula x alba*. La paroi de la ponctuation apparaît plus mince que la paroi primaire du reste du vaisseau.

Les pectines constituent des cibles de choix dans nos recherches des bases moléculaires de la VC. Nous avons démontré un rôle déterminant du calcium lié aux pectines dans la VC et dans la différence entre espèces (Herbette et Cochard, 2010), mais la nature de ce rôle reste à préciser. Le calcium pourrait influencer sur la porosité de la paroi ainsi que sur son élasticité, deux paramètres déterminants pour la VC. Des liaisons covalentes entre les domaines de rhamnogalacturonane II ont aussi été décrites comme des facteurs de la porosité de la paroi primaire des cellules végétales (Fleischer et al., 1999). Ce sont des résidus d'apiose qui forment ces liaisons covalentes sous forme de diester de borate. Le bore, exclusivement retrouvé dans ces liaisons pectiques, sera donc une autre cible de choix dans nos recherches. Pour mieux comprendre le rôle du bore et du calcium, et plus globalement des ions de l'environnement naturel, dans la paroi des ponctuations, leur distribution spatiale sera étudiée. La technique de microscopie électronique analytique, basée sur le couplage d'un microscope électronique à une sonde à rayon X, permettra d'établir une cartographie

des éléments de la paroi (Ergton et al., 1995). Les teneurs en éléments des ponctuations pourront alors être déterminées, afin de tester si il existe une relation avec le niveau de VC. Des sondes fluorescentes existent aussi pour détecter le calcium.

Les approches basées sur la microscopie tiennent une place importante dans ce projet d'élucidation des bases structurelles et moléculaires de la VC, et elles impliquent un investissement humain important et font appel à des techniques récentes et coûteuses. Leur mise en œuvre sera possible grâce aux méthodologies en microscopie et aux compétences en biochimie des pectines de chercheurs de l'unité BIA (Biopolymères Interactions Assemblages, INRA-Nantes), et aux compétences du Dr. Steven Jansen (Université de Ulm), cytologiste du bois spécialiste des ponctuations, et à l'expertise sur la structure du bois et le fonctionnement hydraulique de Hervé Cochard, Eric Badel, Nicole Brunel et Pierre Conchon qui seront donc impliqués dans ces différentes tâches.

V.1.2 Bases génétiques de la VC.

La recherche des gènes clefs de la VC comporte plusieurs niveaux de difficulté et de complexité que nous avons pris en compte. C'est sans doute, une raison expliquant l'absence d'études sur ce sujet. Tout d'abord, la composition de la paroi de la ponctuation d'un vaisseau de xylème est méconnue. La paroi présente classiquement une structure et une biochimie complexe car elle est composée de dérivés phénoliques, de polysaccharides et de protéines très variés avec différents agencements et interactions entre ces composants. L'objectif des approches de microscopie développées ci-avant est donc d'identifier des éléments structuraux et les composants biochimiques de ces ponctuations qui influeraient sur la VC. Ensuite, les bases génétiques de ce métabolisme pariétal sont très complexes et encore méconnues. Pour des polysaccharides tels que les pectines ou encore les hémicelluloses, plusieurs enzymes ou protéines interviennent pour la synthèse des monomères, pour leur assemblage en polymères et pour des modifications de ces polymères une fois en place dans la paroi. Et ces protéines ou enzymes appartiennent souvent à des familles multigéniques. Enfin, la paroi des ponctuations des vaisseaux du xylème ne constitue qu'une zone restreinte de la paroi des vaisseaux. Les approches globales de biochimie (dosage de composés) ou de biologie moléculaire telles que les études d'expression géniques ne permettent pas de la caractériser.

L'ensemble de ces difficultés d'étude nous conduit à choisir des gènes candidats et de valider leur rôle dans la VC par la caractérisation de peupliers transgéniques. Dans un premier temps, nous nous focaliserons sur le rôle des pectines, puisque nous avons montré un rôle déterminant du calcium lié aux pectines dans la VC. Le travail de production et d'analyses de

peupliers transgéniques s'inscrit dans les travaux de la thèse d'Aude Tixier et du stage post-doctoral d'Anais Dusotoit. Les plants transgéniques montrant un changement de leur VC seront ensuite analysés pour identifier les bases structurales et moléculaires associées à ce changement. Ainsi, les propriétés physiques et chimiques de leurs ponctuations seront appréhendées par les approches de microscopie exposées dans le chapitre ci-avant (V.1.1). La structure du xylème de ces peupliers transgéniques sera aussi caractérisée, car elle peut aussi modifier la VC si l'on se réfère à l'hypothèse de « l'aire des ponctuations » aussi appelée « ponctuation rare » défendue par certains auteurs (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005 ; Hacke et al., 2006; Jansen et al., 2009). Elle précise que les ponctuations avec des pores de taille permettant le passage de l'air sont très rares par rapport à la grande majorité des ponctuations avec des pores beaucoup plus étroits. De ce fait, la vulnérabilité d'un conduit donné est fortement influencée par l'aire occupée par la paroi de la ponctuation: plus la surface de la paroi de la ponctuation est grande, plus la probabilité qu'il contient un pore perméable à l'air est élevée; ce qui mène à l'embolie complète du conduit. Le principal argument de cette hypothèse est la corrélation entre l'aire des ponctuations et la VC observée entre espèces (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005; Hacke et al., 2006, Jansen et al., 2009). Il est probable que la modification du métabolisme pectique chez des peupliers transgéniques puisse affecter la taille des vaisseaux, et donc l'aire des ponctuations par vaisseau. Eric Badel qui développe l'analyse tridimensionnelle des vaisseaux du xylème par nanotomographie aurait en charge d'analyser leur structure, leur organisation et l'aire des ponctuations.

Pour palier à l'absence éventuelle de phénotype chez les arbres transgéniques en cours de production et pour obtenir des indications sur les bases moléculaires de la VC, des arbres transgéniques déjà disponibles et caractérisés pourraient être analysés pour leur VC. Quelques peupliers transgéniques modifiés au niveau de la paroi du xylème sont décrits dans la littérature. D'ailleurs, le laboratoire « Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières » de l'INRA d'Orléans nous a fourni différentes lignées de peupliers modifiés pour l'expression de gènes du métabolisme des lignines. Une étude de leurs propriétés hydrauliques est en cours.

V.2 Importance fonctionnelle de la VC

Une finalité des travaux de l'équipe HYDRO, et d'une grande partie de ceux de l'UMR PIAF, vise à prévoir le comportement des espèces ligneuses, longévives, en réponse aux changements climatiques. Des recherches ont été engagées et seront poursuivies pour répondre aux attentes et aux interrogations des forestiers sur: 1) l'identification et la sélection des génotypes les

plus résistants aux sécheresses extrêmes et 2) la capacité des espèces ligneuses à s'adapter à ces événements.

V.2.1 Impacts physiologiques de la cavitation.

Identifier les génotypes ou les écotypes d'essences forestières les plus résistants aux événements climatiques extrêmes est un enjeu majeur pour la recherche forestière. La VC est un trait de fonctionnement fortement corrélé à la tolérance à la sécheresse des ligneux et pourrait alors être proposé comme critère de sélection. Pour valider cette démarche, il nous faut vérifier si la sûreté hydraulique est déterminante pour la survie des arbres en conditions de sécheresse. Les résultats de Brodribb et Hervé Cochard (2009) sont encourageants car ils montrent que le potentiel hydrique létal est fortement corrélé au P50 de tiges chez plusieurs espèces de conifères d'Australie. Il reste à vérifier la généralité de ces résultats, notamment chez les espèces angiospermes de nos milieux tempérés.

Pour commencer, des expérimentations en conditions contrôlées seront conduites pour mettre en évidence l'existence éventuelle de relations de causalité entre les traits de sûreté hydraulique et la résistance à la sécheresse des espèces. Ces travaux seront menés, sous le contrôle de Têtè Barigah, grâce à l'acquisition récente d'une plateforme de tolérance à la sécheresse équipée de 80 balances de pesées. Il sera alors possible de contrôler et de suivre l'état hydrique de différentes espèces forestières (chênes, peupliers, hêtres, ...). Des premiers travaux sur hêtre indiquent que la mortalité des plants survient dès lors que les vaisseaux sont embolisés à 90 %.

V.2.2 Rôle adaptatif de la VC.

Les forestiers s'interrogent sur la capacité d'adaptation des espèces longévives aux changements climatiques brutaux. D'après les modèles climatiques, les vitesses de déplacements des aires de distribution des espèces seront supérieures aux vitesses de déplacements des populations, surtout en ce qui concerne les espèces ligneuses. Ces modifications généreront des pressions de sélection qui auront un impact direct sur la survie des espèces. Seule la corrélation entre la VC et la résistance à la sécheresse à l'échelle interspécifique suggère que la VC est un caractère adaptatif, mais des études à l'échelle intra-spécifique sont nécessaires pour valider le rôle adaptatif de la VC. Une réflexion est menée avec Boris Fumanal pour développer une approche d'écologie moléculaire visant à analyser les pressions de sélection pour la VC. Il est prévu d'analyser la diversité génétique naturelle des gènes identifiés comme important pour la VC dans le

projet ANR « Pitbulles ». La diversité génétique sélectionnée (gènes de la VC) sera alors comparée à la diversité génétique neutre des populations afin d'analyser les processus démographiques et sélectifs qui affectent les gènes et les populations, en lien avec la contrainte hydrique. Par ailleurs, des études d'association entre la diversité génétique de ces gènes et la variabilité de la VC permettront d'identifier les gènes importants dans la variabilité de la VC des populations naturelles. Ces approches sont nouvelles pour l'unité et le principal frein à la progression de cette thématique, et plus globalement des approches écologiques, est l'accès à un dispositif ad hoc. Plusieurs pistes de dispositifs sont explorées pour le hêtre, le peuplier ou encore l'hévéa.

V.2.3 Plasticité de la vulnérabilité à la cavitation

Dans les chapitres précédents, nous avons évoqué l'importance de la plasticité phénotypique de la VC. D'après les travaux de thèse de Rémi Wortemann, les populations de hêtres présenteraient une capacité d'acclimation de leur VC qui jouerait un rôle dans la réponse aux changements climatiques. Nous avons aussi montré que la teneur hydrique du sol et le facteur lumineux module fortement la VC (Figure 6 ; Herbette et al., 2010 ; Awad et al., 2010). Cependant, ces résultats n'expliquent les différences que nous avons pu noter entre des populations naturelles (figure 4): les populations de hêtres du Mont Ventoux, à la limite Sud de l'aire de répartition française, sont les populations les plus vulnérables à la cavitation alors que les populations les plus au Nord (Graoully et Hesse) sont les moins vulnérables. Sur le Mont Ventoux, les populations réparties sur le versant Sud sont plus vulnérables que les populations du versant Nord où les conditions hydriques sont plus favorables (Herbette et al., 2010). L'acclimation pouvant jouer un rôle clef dans le contexte des changements climatiques, il est nécessaire d'identifier les facteurs qui modulent la plasticité phénotypique de ce caractère de résistance à la sécheresse pour aider les forestiers et gestionnaires dans les prises de décisions sur les modes de gestion des peuplements. Plusieurs expérimentations s'avèrent nécessaires pour identifier ces facteurs de la plasticité phénotypique de la VC et m'amène donc à proposer un sujet de thèse.

Titre : « Identification des facteurs modulant la vulnérabilité à la cavitation du xylème chez les arbres. ».

Contexte scientifique : Nous savons que la VC est un caractère qui dépend de la structure du xylème et qui ne varie pas ou très peu avec les variations saisonnières (Herbette et al., 2010). Nous avons montré que la VC est très dépendante des valeurs minimales de potentiel hydrique du xylème subie par la plante au cours de sa croissance (Awad et al., 2010). Il faut donc considérer les conditions hydriques qui règnent pendant la formation du xylème afin d'analyser plus finement le lien entre l'état hydrique de la plante et la formation du xylème. La période et la vitesse de

formation du xylème sont très différentes selon les espèces, notamment entre les espèces pionnières et les espèces post-pionnières ou climaciques dont la croissance est généralement plus lente et plus courte. Les facteurs et les capacités d'acclimatation doivent donc être étudiés sur des espèces aux écologies différentes. Des caractères de tolérance à la sécheresse, autre que la VC, peuvent aussi avoir une incidence sur la VC. Des études sur des populations de hêtres réparties le long de gradient de précipitations expliquent la tolérance à la sécheresse par des paramètres morphologiques ou de croissance comme un ratio de biomasse racines/partie aérienne plus élevé. Il est possible d'analyser le rôle de l'appareil racinaire sur la VC de la partie aérienne en modulant son développement.

Expérimentations envisagées : Plusieurs espèces seront analysées : Peuplier, bouleau, hêtre et charme. Dans la mesure du possible, les analyses porteront sur des clones ou des populations naturelles aux VC contrastées. Chacune des espèces sera analysée dans plusieurs conditions permettant d'obtenir des états hydriques différents liés au régime hydrique ou à l'architecture racinaire : en plein champ et en pot, en régime hydrique favorable ou défavorable, après une année de sécheresse modérée ou après une sécheresse brutale. Le suivi sera réalisé sur 2 ou 3 ans et les mesures feront appel aux techniques classiques de l'hydraulique.

V.2.4 Compromis avec d'autres caractères.

Les espèces tolérantes à la sécheresse semblent développer une faible VC alors que les espèces des milieux humides sont au contraire très vulnérables. Il existerait donc des contraintes fonctionnelles, ou compromis, à développer un xylème plus résistant à la cavitation. En plus de l'intérêt fondamental de ces compromis, l'utilisation de la VC comme critère de sélection pour la tolérance à la sécheresse implique d'identifier ces compromis.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre les propriétés mécaniques du bois et les paramètres de sureté hydraulique que sont la VC ou la résistance à l'implosion (Rosner et al., 2008; Utsumi et al., 2010; Pratt et al., 2007). Cependant les relations de causalité restent inexpliquées et incertaines. Eric Badel et Hervé Cochard, en collaboration avec l'équipe MECA dont les recherches portent sur la réponse des plantes à un environnement mécanique fluctuant, exploreront les relations entre les propriétés hydrauliques et mécaniques du bois. Je leur ai proposé d'analyser les bases génétiques de ce compromis, par des approches de transgénèse. Ainsi, les peupliers transgéniques qui seront analysés pour leur VC dans le cadre du projet « Pitbulles » seront aussi analysés pour leurs propriétés mécaniques et la structure du bois, voire sa chimie. L'objectif est de tester l'impact de modifications du métabolisme pariétal sur les 2 fonctions du bois, pour *in fine* valider ou invalider l'existence de ce compromis, et en élucider les bases.

L'élaboration d'un xylème plus résistant à la cavitation impose probablement d'autres contraintes. Il est notamment proposé qu'une faible VC nécessite la construction d'un bois plus dense (Hacke et al., 2001), et constituerait donc une contrainte énergétique et de croissance. Ces hypothèses reposent sur des comparaisons inter-spécifiques, et nous envisageons de les valider à l'échelle intra-spécifique. Cette étude fera partie d'un sujet de thèse qui portera sur la variabilité génétique des caractères de tolérance à la sécheresse chez l'hévéa. Nous envisageons de la mettre en œuvre grâce à une collaboration avec le CIRAD, l'Université Kasetsart de Bangkok et le RRIT (Rubber Research Institute of Thailand).

Titre : « Variabilité génétique de la tolérance à la sécheresse chez l'hévéa ».

Contexte scientifique : En Thaïlande, un des principaux pays producteurs de caoutchouc naturel, la contrainte la plus importante pour l'hévéaculture est la sécheresse. Ce problème qui concerne aussi d'autres pays (Brésil, Inde et Chine) s'accroît avec le développement de plantations dans des zones plus sèches. En outre, la culture de l'hévéa en Thaïlande se caractérise par l'utilisation d'un seul clone, RRIM600, sur plus de 80% de la superficie plantée. Ce clone a révélé d'assez bons résultats dans la plupart des domaines. Cependant, les connaissances sur la variabilité génétique de la réponse au stress hydrique de l'hévéa sont mal documentées, alors qu'il y a un besoin important d'identifier les clones tolérants à la sécheresse tout en maintenant, voire en augmentant, la productivité pour répondre à une demande croissante de l'industrie du caoutchouc. De nouveaux clones ont été créés dans un programme du RRIT, et de nouveaux outils génétiques (marqueurs moléculaires) ont été utilisés pour préparer le développement de la sélection assistée par marqueurs. Un dispositif de ces clones est toujours disponible et bien adapté pour ce projet de thèse.

Expérimentations envisagées : Des cartes génétiques sont déjà disponibles, et il sera donc possible d'entreprendre une recherche de QTL de VC, ainsi qu'une recherche de QTL pour d'autres caractères potentiellement en interaction avec la VC : conductance hydraulique, efficacité d'utilisation de l'eau, croissance, densité du bois, propriétés mécaniques. Des QTL liés à des paramètres de croissance et de production de latex sont déjà disponibles et on peut envisager d'analyser leur co-localisation avec les QTL que nous mettrons en évidence. Suite à des épisodes de sécheresses, des données sur la mortalité des génotypes ou sur d'autres réponses aux stress sont disponibles et pourront donc être mis en relation avec les données de VC. Ces phénotypes pourront être réalisés sur les périodes de pluie et sur les périodes sèches. L'objectif scientifique est de mettre en relation la VC avec d'autres traits et d'identifier des bases génétiques de la VC et de ces relations; l'objectif finalisé étant de sélectionner des clones tolérants à la sécheresse.

V.3 Fonctionnement hydraulique

Les travaux en cours ou envisagés qui sont présentés dans ce mémoire portent exclusivement sur un seul caractère de la sûreté hydraulique: la VC. Les résistances au flux d'eau, en différents points de la plante, assurent aussi la sûreté et l'efficacité du fonctionnement hydraulique. Une des autres thématiques de l'équipe, dans laquelle je ne suis pas impliqué, porte sur la résistance hydraulique foliaire et son contrôle par les aquaporines. Cette thématique est conduite par Hervé Cochard, Jean-Stéphane Venisse et Aurélié Gousset. Deux paramètres du fonctionnement hydraulique sont encore très peu connus et pourraient impliquer les compétences et les outils développés dans l'équipe : la réparation de l'embolie et le contrôle symplasmique de la conductance hydraulique foliaire.

V.3.1 Réparation de l'embolie

Des réparations d'embolie du xylème qui conduisent au re-remplissage des vaisseaux embolisés, ont été observées sur différentes espèces (Holbrook et Zwieniecki, 1999 ; Hacke et Sperry, 2003). Cependant, ce phénomène de réparation de l'embolie est toujours controversé car le mécanisme n'est pas connu et n'est pas clairement expliqué (Tyree et al., 1999). La capacité de restauration des vaisseaux constitue un paradoxe dans la mesure où les vaisseaux sont connectés entre eux en réseau et leur sève est sous tension. Il est inconcevable en théorie de comprimer l'air contenu dans un vaisseau, si celui-ci est connecté à d'autres vaisseaux sous tension. Trois questions doivent être résolues pour expliquer le mécanisme de réparation : 1) D'où provient l'eau qui permet le re-remplissage ? 2) Comment est-elle mise sous pression pour comprimer l'air ? 3) Comment le processus de réparation est-il compartimenté, puis comment le vaisseau réparé est-il reconnecté aux autres vaisseaux ? Un rôle des aquaporines a été proposé, mais leur implication et leur rôle exact reste à démontrer (Secchi et Zwieniecki, 2010).

S'il existe, ce phénomène de réparation de l'embolie estivale est très important car cela signifierait qu'il existe plusieurs stratégies de tolérance à la sécheresse, notamment concernant la sûreté hydraulique. C'est donc un nouvel axe de recherche que nous envisageons de développer au sein de l'équipe. Dans un premier temps, nous déterminerons les conditions dans lesquelles cette réparation de l'embolie s'opérerait. Des expérimentations seront menées sur plusieurs espèces dont les VC sont contrastées et aux écologies différentes (pionnières / climaciques). Les capacités de restauration seront testées dans différentes conditions : variations journalières, après une sécheresse brutale, pour différents niveaux d'embolie et différents états hydriques. La tomographie devrait nous renseigner sur les mécanismes de cette réparation. Pour préciser ces mécanismes, nous

envisageons des études d'expression des aquaporines complétées par des déterminations de leurs localisations tissulaires ou cellulaires.

Cette question de la réparation avait déjà été traitée, par l'unité, pour l'embolie hivernale, induite par le gel. En hiver, la sève des vaisseaux n'étant pas sous tension, la réparation de l'embolie s'explique plus facilement, car le processus de réparation n'implique pas d'isoler le vaisseau embolisé des autres vaisseaux. Les aquaporines ont aussi été proposées pour expliquer la réparation de l'embolie hivernale (Sakr et al., 2003). Cette réparation impliquerait aussi le déversement de sucre dans le xylème (Descourteix et al., 2006). Des suivis et des analyses sur les mêmes arbres en hiver renseigneraient aussi sur les capacités et les mécanismes de réparation de l'embolie estivale et de l'embolie hivernale pendant l'hiver. Ces questions, à l'interface des questions de biologies estivale et hivernale, ont sûrement un impact sur la productivité ainsi que sur la survie des arbres.

V.3.2 Contrôle « pariétal » de la résistance hydraulique (RH) foliaire

La RH foliaire représente 50 % de la RH des parties aériennes et jusqu'à 30 % de la RH totale de la plante. Par ailleurs, cette résistance est très variable et sous contrôle des facteurs environnementaux tels que la température ou la lumière. L'équipe s'est donc logiquement intéressée à cette composante majeure de l'architecture hydraulique de l'arbre. Pour le prochain quadriennal (2011-2014), les travaux d'une partie de l'équipe se focaliseront sur les facteurs environnementaux modulant la RH foliaire des arbres, et le rôle des aquaporines dans cette modulation. Le mouvement radiale de l'eau, du xylème vers les chambres sous-stomatiques, peut suivre une voie apoplasique ou peut se faire de cellule à cellule. Cette dernière voie comprend une phase symplasmique (par les plasmodesmes) avec des passages transcellulaires (à travers la membrane plasmique). Les aquaporines de la membrane plasmique ont déjà été proposées pour expliquer, au moins partiellement, des variations rapides (quelques dizaines de minutes) de la RH foliaire (Cochard et al., 2007). Cependant, le rôle de la paroi n'a pas encore été considéré dans les variations de RH, probablement parce qu'elle est considérée comme peu modulable. Pourtant, il existe maintenant de nombreux travaux montrant un contrôle de la RH du xylème par la force ionique de la sève. Nous avons d'ailleurs montré que ces effets sont très variables selon les espèces (Cochard et al., 2010). Au-delà du prochain quadriennal, nous serons probablement amenés à reconsidérer le rôle de la paroi des voies apoplasique et symplasmique dans la modulation de la RH foliaire. De plus, une étude récente montre qu'une modification de la composition de la paroi perturbe la transpiration foliaire chez *Arabidopsis thaliana* (Liang et al., 2010). Etudier le rôle de la paroi implique de

distinguer les variations rapides de RH (quelques dizaines de minutes à quelques heures) des variations plus lentes (quelques dizaines de jours) liées aux conditions environnementales du développement foliaire. Les expérimentations à mettre en place seront destinées à :

- 1) Prendre en compte le rôle de la composition ionique de la sève dans la RH foliaire.
- 2) Mettre en relation des variations de RH avec des variations structurelles de la paroi (épaisseur, densité, structure et densité des ponctuations et des plasmodesmes).
- 3) Analyser l'effet de modifications du métabolisme pariétal sur la RH foliaire.

Cette thématique est une suite logique aux travaux sur les bases moléculaires de la VC et à ceux sur la RH foliaire et elle mobiliserait donc les compétences de l'ensemble de l'équipe. Par ailleurs, certains outils et techniques que nous aurons développés dans le projet « Pitbulles » pourront être mis à profit pour ces études : approches de microscopie, immunomarquages, lignées de peupliers transgéniques.

V.4 Le choix de l'espèce végétale

Nos recherches des mécanismes moléculaires de la VC sont menées sur le peuplier qui présente des caractéristiques intéressantes. Sa transformation génétique et sa micro-propagation *in vitro* sont maîtrisées, sa variabilité génétique (différentes espèces, clones et hybrides interspécifiques) et sa croissance rapide permettent d'entreprendre des expérimentations en conditions contrôlées. Pour ces raisons, de nombreux auteurs ont utilisé le peuplier comme modèle ligneux. Bien que les peupliers soient des espèces privilégiées pour élucider les mécanismes moléculaires du fonctionnement hydraulique, une autre espèce, *Arabidopsis thaliana*, présente certains avantages. Les outils et les données génomiques sont plus développés chez cette espèce modèle, et de nombreux mutants sont disponibles. De plus, l'arabette de Thalius a été proposée comme modèle d'étude pour la formation du bois chez les arbres (Chaffey et al., 2002 ; Nieminen et al., 2004). Nous envisageons d'analyser certains mutants d'*Arabidopsis* pour appréhender plus facilement et plus rapidement les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Actuellement, nous testons l'utilisation de l'arabette comme modèle d'étude du fonctionnement hydraulique des arbres, à commencer par la VC. Nous sommes confiants car la courbe de VC obtenue sur des hampes florales d'arabette est comparable aux courbes obtenues sur des espèces d'arbres comme le peuplier ou le saule.

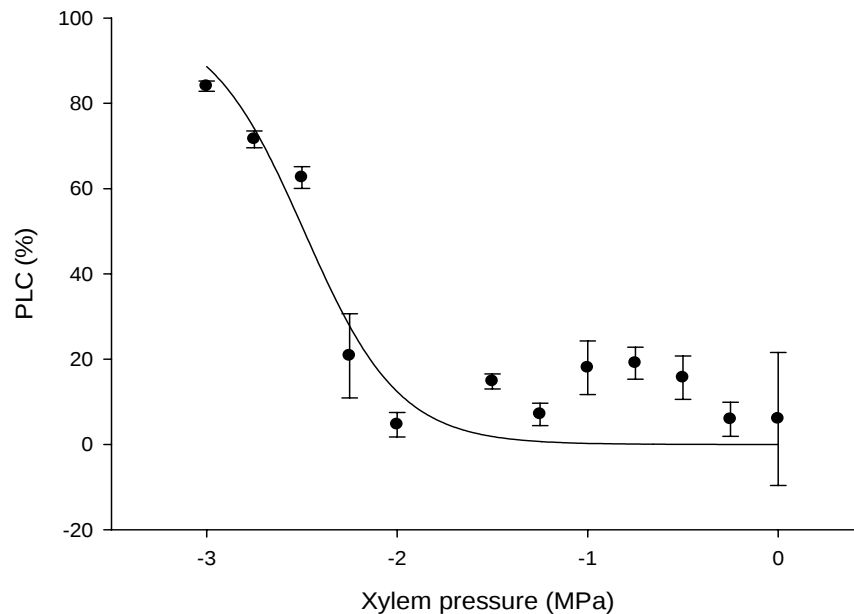


Figure 12 : Exemple d'une courbe de vulnérabilité à la cavitation de hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* cv Columbia. Chaque point représente une moyenne ($\pm$ ES) obtenue sur 3 à 6 hampes florales. Les lignes représentent un ajustement des points de données selon l'équation de Pammenter et Van Der Willigen (1998).

Les recherches de l'unité sur les mécanismes physiologiques sont pour l'essentiel des recherches génériques, avec une volonté de valider la genericité des résultats obtenus. Ces recherches génériques justifient d'utiliser des plantes modèles comme le peuplier ou l'arabette. Elles conduisent aussi à travailler sur des espèces relativement diverses, pour des raisons pratiques (dispositif ad hoc, collaboration) et/ou parce qu'elles présentent des intérêts agro-économiques comme l'hévéa. Cependant, les recherches envisagées sur l'importance fonctionnelle de la VC, ou d'autres caractères hydrauliques, nécessitent aussi de considérer les espèces selon leurs écologies. Ainsi, pour certaines perspectives, nous envisageons de comparer le comportement d'espèces contrastées pour la tolérance à la sécheresse, leur fonctionnement hydraulique, la croissance, leur appartenance à des communautés végétales (ex : pionnières/longévives, sciaphiles/héliophiles, ...).

VI Conclusions

Le contexte du changement climatique génère des interrogations sur les capacités d'acclimatation et/ou d'adaptation des espèces longévives comme les arbres, notamment face aux sécheresses extrêmes. Ces interrogations liées au manque d'information sur l'écophysiologie des espèces nous confortent sur l'intérêt d'élucider les bases moléculaires et génétiques de la VC et

elles justifient pleinement la pertinence des travaux et des perspectives sur l'importance fonctionnelle de la VC et sur le fonctionnement hydraulique de l'arbre.

VII Références citées

- Angeles, G., B. Bond, J.S. Boyer, T. Bodribo, M.J. Burns, J. Cavender-Bares, M. Clearwater, H. Cochard, J. Comstock, J.C. Domec, L. Donovan, F. Ewers, B. Gartner, U. Hacke, T. Hinckley, N.M. Holdbrook, H.G. Jones, J. Lopez-Portillo, C. Lovisolo, T. Martin, J. Martinez-Vilalta, S. Mayr, F.C. Meinzer, P. Melcher, M. Mencuccini, S. Mulkey, A. Nardini, H.S. Neufeld, J. Passioura, W.T. Pockman, R.B. Pratt, S. Rambal, H. Richter, L. Sack, S. Salleo, A. Schubert, P. Schulte, J.P. Sparks, J. Sperry, R. Teskey and M. Tyree 2004. The Cohesion-Tension Theory. *New Phytologist*. 163:451-452.
- Awad, H., T. Barigah, E. Badel, H. Cochard and S. Herbette 2010. Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*. 139:280-288.
- Brodribb, T.J. and H. Cochard 2009. Hydraulic Failure Defines the Recovery and Point of Death in Water-Stressed Conifers. *Plant Physiology*. 149:575-584.
- Chaffey, N., E. Cholewa, S. Regan and B. Sundberg 2002. Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia Plantarum*. 114:594-600.
- Chaves, M.M., J.P. Maroco and J.S. Pereira 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30:239-264.
- Choat, B., M. Ball, J. Luly and J. Holtum 2003. Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology*. 131:41-48.
- Cochard, H. 2002. A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell and Environment*. 25:815-819.
- Cochard, H., T. Ameglio and P. Cruiziat 2001. The cohesion theory debate continues - Response by Herve Cochard, Thierry Ameglio and Pierre Cruiziat. *Trends in Plant Science*. 6:456-456.
- Cochard, H., S.T. Barigah, M. Kleinhentz and A. Eshel 2008. Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *Journal of Plant Physiology*. 165:976-982.
- Cochard, H., E. Casella and M. Mencuccini 2007. Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiology*. 27:1761-1767.
- Cochard, H., P. Cruiziat and M.T. Tyree 1992. Use of positive pressures to establish vulnerability curves. Further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology*. 100:205-209.
- Cochard, H., G. Damour, C. Bodet, I. Tharwat, M. Poirier and T. Ameglio 2005. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum*. 124:410-418.
- Cochard, H., S. Herbette, T. Barigah, E. Badel, M. Ennajeh and A. Vilagrosa 2010. Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitrion spinning technique. *Plant Cell and Environment*. 33:1543-1552.
- Cochard, H., S. Herbette, E. Hernandez, T. Holtta and M. Mencuccini 2010. The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *Journal of Experimental Botany*. 61:275-285.
- Cochard, H., T. Holtta, S. Herbette, S. Delzon and M. Mencuccini 2009. New Insights into the Mechanisms of Water-Stress-Induced Cavitation in Conifers. *Plant Physiology*. 151:949-954.
- Cochard, H., D. Lemoine and E. Dreyer 1999. The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant, Cell and Environment*. 22:101-108.

- Cochard, H., J.S. Venisse, T.S. Barigah, N. Brunel, S. Herbette, A. Guilliot, M.T. Tyree and S. Sakr 2007. Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiology*. 143:122-133.
- Decourteix, M., G. Alves, N. Brunel, T. Ameglio, A. Guilliot, R. Lemoine, G. Petel and S. Sakr 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant Cell and Environment*. 29:36-47.
- Depège, N., J. Drevet and N. Boyer 1998. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *Eur J Biochem*. 253:445-51.
- Egerton, R.F. and M. Malac 2005. EELS in the TEM. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 143:43-50.
- Fichot, R., T.S. Barigah, S. Chamaillard, D. Le Thiec, F. Laurans, H. Cochard and F. Brignolas 2010. Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant Cell and Environment*. 33:1553-1568.
- Fleischer, A., M.A. O'Neill and R. Ehwald 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology*. 121:829-838.
- Hacke, U.G. and J.S. Sperry 2003. Limits to xylem refilling under negative pressure in *Laurus nobilis* and *Acer negundo*. *Plant Cell and Environment*. 26:303-311.
- Hacke, U.G., J.S. Sperry, W.T. Pockman, S.D. Davis and K.A. McCulloh 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*. 126:457-461.
- Hacke, U.G., J.S. Sperry, J.K. Wheeler and L. Castro 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology*. 26:689-701.
- Hargrave, K.R., K.J. Kolb, F.W. Ewers and S.D. Davis 1994. Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist*. 126:695-705.
- Herbette, S., N. Brunel, G. Prensier, J. Julien, J. Drevet and P. Roeckel-Drevet 2004. Immunolocalization of a plant glutathione peroxidase-like protein. *Planta*. 219:784-789.
- Herbette, S. and H. Cochard 2010. Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant Physiol*. 153:1932-9.
- Herbette, S., J.T. Da Labrouhe, C. Lenne, J.L. Julien, J.R. Drevet and P. Roeckel-Drevet 2003. Characterization of glutathione peroxidase (GPX)-like genes in higher plants. *Free Radical Research*. 37:23-23.
- Herbette, S., D.T.d. Labrouhe, J.R. Drevet and P. Roeckel-Drevet 2011. Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. *Plant Science*. 180:548-553.
- Herbette, S., C. Lenne, N. Leblanc, J.L. Julien, J.R. Drevet and P. Roeckel-Drevet 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*. 269:2414-2420.
- Herbette, S., A.L. Menn, P. Rousselle, T. Ameglio, Z. Faltin, G. Branlard, Y. Eshdat, J.L. Julien, J.R. Drevet and P. Roeckel-Drevet 2005. Modification of photosynthetic regulation in tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1724:108-18.
- Herbette, S., L. Taconnat, V. Hugouvieux, L. Piette, M.L.M. Magniette, S. Cuine, P. Auroy, P. Richaud, C. Forestier, J. Bourguignon, J.P. Renou, A. Vavasseur and N. Leonhardt 2006. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*. 88:1751-1765.
- Herbette, S., R. Wortemann, H. Awad, R. Huc, H. Cochard and T.S. Barigah 2010. Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology*. 30:1448-1455.
- Holbrook, N.M. and M.A. Zwieniecki 1999. Embolism repair and xylem tension. Do we need a

miracle ? Plant Physiology. 120:7-10.

- Jansen, S., B. Choat and A. Pletsers 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *Am. J. Bot.* 96:409-419.
- Jarbeau, J.A., F.W. Ewers and S.D. Davis 1995. The mechanism of water-stress-induced embolism in two species of chaparral shrubs. *Plant, Cell and Environment*. 18:189-196.
- Kavanagh, K.L., B.J. Bond, S.N. Aitken, B.L. Gartner and S. Knowe 1999. Shoot and root vulnerability to xylem cavitation in four populations of Douglas-fir seedlings. *Tree Physiology*. 19:31-37.
- Liang, Y.K., X.D. Xie, S.E. Lindsay, Y.B. Wang, J. Masle, L. Williamson, O. Leyser and A.M. Hetherington 2010. Cell wall composition contributes to the control of transpiration efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 64:679-686.
- Maherali, H., W.T. Pockman and R.B. Jackson 2004. Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology*. 85:2184-2199.
- Mai, J., S. Herbette, M. Vandame, E. Cavaloc, J.-L. Julien, T. Améglio and P. Roeckel-Drevet 2010. Contrasting strategies to cope with chilling stress among clones of a tropical tree, *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiology*. 30:1391-1402.
- Mai, J., S. Herbette, M. Vandame, B. Kositsup, P. Kasemsap, E. Cavaloc, J.-L. Julien, T. Améglio and P. Roeckel-Drevet 2009. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* <i>Muell. Arg. Trees - Structure and Function. 23:863-874.
- Nieminen, K.M., L. Kauppinen and Y. Helariutta 2004. A weed for wood? *Arabidopsis* as a genetic model for xylem development. *Plant Physiology*. 135:653-659.
- Pammenter, N.W. and C. Van Der Willigen 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology*. 18:589-593.
- Pratt, R.B., A.L. Jacobsen, F.W. Ewers and S.D. Davis 2007. Relationships among xylem transport, biomechanical and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist*. 174:787-798.
- Rosner, S., A. Klein, U. Muller and B. Karlsson 2008. Tradeoffs between hydraulic and mechanical stress responses of mature Norway spruce trunk wood. *Tree Physiology*. 28:1179-1188.
- Sakr, S., G. Alves, R.L. Morillon, K. Maurel, M. Decourteix, A. Guilliot, P. Fleurat-Lessard, J.L. Julien and M.J. Chrispeels 2003. Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiology*. 133:630-641.
- Secchi, F. and M.A. Zwieniecki 2010. Patterns of PIP gene expression in *Populus trichocarpa* during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP1 aquaporin subfamily as moderators of refilling process. *Plant Cell and Environment*. 33:1285-1297.
- Siedlecka, A., S. Wiklund, M.A. Peronne, F. Micheli, J. Lesniewska, I. Sethson, U. Edlund, L. Richard, B. Sundberg and E.J. Mellerowicz 2008. Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiol.* 146:554-65.
- Sperry, J.S. 1986. Relationship of xylem embolism to xylem pressure potential, stomatal closure, and shoot morphology in the palm *Rhapis excelsa*. *Plant Physiology*. 80:110-116.
- Tissier, J., L. Lambs, J.P. Peltier and G. Marigo 2004. Relationships between hydraulic traits and habitat preference for six *Acer* species occurring in the French Alps. *Annals of Forest Science*. 61:81-86.
- Tyree, M.T., S. Salleo, A. Nardini, M.A. Lo Gullo and R. Mosca 1999. Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm ? *Plant Physiology*. 120:11-21.
- Tyree, M.T. and J.S. Sperry 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology*. 40:19-38.
- Utsumi, Y., E.G. Bobich and F.W. Ewers 2010. Photosynthetic, hydraulic and biomechanical responses of *Juglans californica* shoots to wildfire. *Oecologia*. 164:331-338.
- Van Ieperen, W., U. van Meeteren and H. van Gelder 2000. Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. *Journal of Experimental Botany*. 51:769-776.

- Wheeler, J.K., J.S. Sperry, U.G. Hacke and N. Hoang 2005. Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell and Environment*. 28:800-812.
- Zwieniecki, M.A., P.J. Melcher and N.M. Holbrook 2001. Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science (Washington)*. 291:1059-1062.