



HAL
open science

Physique et biologie moléculaire de la vulnérabilité du xylème à la cavitation

Aude Tixier

► **To cite this version:**

Aude Tixier. Physique et biologie moléculaire de la vulnérabilité du xylème à la cavitation. Biologie végétale. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2013. Français. NNT: . tel-02811458

HAL Id: tel-02811458

<https://hal.inrae.fr/tel-02811458v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



***ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique moléculaires

Aude TIXIER

Date de soutenance le 16 décembre 2013

**PHYSIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA
VULNERABILITE DU XYLEME A LA CAVITATION**

Jury

Rapporteurs

Sylvain Delzon Chargé de recherche, Université de Bordeaux

Mylène Durand-Tardif Directeur de recherche, INRA, Versailles

Examineurs

Jean-Louis Julien Professeur, Université Blaise Pascal

Eric Badel Chargé de recherche, INRA, Clermont-Ferrand

Stéphane Herbette Maître de conférences, Université Blaise-Pascal (directeur de recherche)

Steven Jansen Professeur, Université d'Ulm (directeur de recherche)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier Mylène Durand-Tardif et Sylvain Delzon d'avoir accepté de relire ce travail de thèse en d'en être les rapporteurs. Je remercie Jean-Louis Julien d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Je voudrais remercier tout particulièrement Stéphane Herbette et Steven Jansen qui ont dirigé ces travaux durant trois ans. Je remercie Stéphane de cette opportunité qu'il m'a offerte de travailler sur ce sujet et de l'encadrement dont j'ai bénéficié. Il a été d'une grande disponibilité et s'est intéressé de près à l'avancée de mes travaux. Son aide et ses conseils ont porté aussi bien sur des questions techniques que scientifiques. Je suis reconnaissante des enseignements aux techniques d'hydrauliques et de biologie moléculaire mais aussi de la formation scientifique. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que ses conseils m'ont guidé tout au long de ce travail. Je remercie Steven Jansen pour son accueil et encadrement à l'université d'Ulm en Allemagne. Son intérêt pour mes travaux et ses conseils ont été d'une grande aide pour la réalisation de ce projet de thèse. Je le remercie de ses enseignements sur l'anatomie du bois et de ces conseils éclairés pour la rédaction d'articles.

Je remercie Eric Badel d'avoir participé à mon encadrement depuis le stage de master réalisé dans le laboratoire du PIAF. Je lui suis reconnaissante de m'avoir enseigné tout ce que je sais en mécanique des matériaux. Je le remercie de son implication dans les travaux que nous avons réalisés.

Je remercie Sylvain Delzon, Patricia Drevet, Gregory Mouille, Eric Badel et Hervé Cochard, membres de mon comité de thèse. Merci pour vos avis éclairés et vos conseils pour orienter ce projet.

Merci à Jean Louis Julien de m'avoir accueilli au sein de l'UMR PIAF. Je remercie aussi Hervé Cochard pour son accueil au sein de l'équipe HYDRO. Merci d'avoir rapidement et systématiquement répondu à mes questions scientifiques et techniques. Je voudrais également remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail : Christian Bodet, Christelle Boisselet, Nicole Brunel, Marie Capron, Pierre Conchon, Anais Dusautoit, Jérôme Franchel, Julia Huber, Matthias Klepsch, Sylvaine Labernia, Hans Malchus, Stéphanie Massey, Ellen Salzer, et Alexander Scholz. Les membres de l'UMR PIAF et de l'Institut für Systematische Botanik und Ökologie ont toujours été très disposés à apporter leur aide. Je les remercie sincèrement.

Enfin, je remercie les personnes de mon entourage professionnel et personnel pour leur soutien et leur présence durant ces trois ans.

ABBREVIATIONS

A : assimilation nette de CO₂

A_p : Aire de ponctuation

A_s : surface de section de bois fonctionnel de la tige

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN_c : ADN complémentaire

ADN_g : ADN génomique

ADN_p : ADN plasmidique

AFM : Atomic Force Microscopy

AGA : Apiogalacturonanes

ANOVA : Analyse de variance

ANR : Agence Nationale de la recherche

ARN : Acide ribonucléique

AXS : Apiose xylose synthase

b : diamètre de la lumière d'un vaisseau

BIA : Unité INRA Biopolymères, Interactions, Assemblages

BP : réaction de recombinaison entre site attB et attP

CamR : gène de résistance au chloramphénicol

ccdB : inhibiteur de girase A462

Csl : Cellulose synthase like

CT : Cycle seuil (threshold cycle)

D : diamètre de vaisseau

DIG : digoxygénine

D.O : densité optique

E : Taux d'évaporation

FAA : formol, acide acétique, alcool (éthanol)

F_c : Intervessel contact fraction

F_{PF} : Intervessel pit-field fraction

FW : Amorce sens (forward)

g_b : Conductance de la couche limite

GDP : guanosine diphosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GIEC : Groupe Intergouvernemental d'Expert sur l'évolution du Climat

GMD : GDP mannose 4-6 déhydratase

GUS : glucuronosidase

g_s : conductance stomatique

H : Heure

HG : Homogalacturonanes

IMFT : Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse

k : conductance

K_h : Conductivité hydraulique (mesurée)

K_{ht} : Conductivité théorique

KJ : kilo Joule

K_s : Conductivité spécifique

K_{hts} : Conductivité théorique spécifique

L : Longueur de segment de tige ou de vaisseaux (m)

LB : bordure gauche

LR : réaction de recombinaison entre site attL et attR

M : Margo

MAP : microtubule associated protein

MET : Microscopie électronique à transmission

MEB : Microscopie électronique à balayage

MPa : Méga Pascal

MS : Matière sèche

NCBI : National center for biotechnology information

nt : nucléotides

ONF : Office National des Forêts

P : Pression

P_e : pression d'entrée

P₅₀ : pression su xylème induisant 50% de perte de conductance

Pa : Pascal

PB : Lignée transgénique PitBulle

PCR : Polymerase chain reaction

pDEST : plasmide de destination

pDONR : plasmide donneur

PEG : polyéthylène glycol

pENTR : plasmide d'entrée

PG : Polygalacturonase

pEXPR : plasmide d'expression

PIAF : UMR Physique et physiologie de l'arbre fruitier et forestier

PLC : Pourcentage de perte de conductance

PME : pectine méthylestérase

R : Résistance

RB : bordure droite

RG-II : rhamnogalacturonane

RT : reverse transcription

RV : Amorces antisens (reverse)

S : pente de courbe de vulnérabilité à la cavitation au niveau de P_{50}

SD : écart-type

SE : erreur standard

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SVP : Saturated vapor pressure

t : épaisseur de la paroi des vaisseaux

T : Torus

T35S : Termineur 35S

T_m : Température d'hybridation des amorces

TDZ : thiadiazuron

UDP : Uridine diphosphate

v : Volume

VPD : vapor pressure deficit

WUE : Water Use efficiency

XGA : xylogalacturonanes

XTH : xyloglucane endo transglucosylase

η : viscosité de l'eau

τ : tension de surface de l'eau

Ψ : Potentiel hydrique

ρ : densité de l'eau

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 1 |
| <u>I PROPRIETES HYDRIQUES DE LA PLANTE.....</u> | 3 |
| 1) <i>Quelques propriétés de l'eau</i> | 3 |
| 2) <i>Notions de potentiel hydrique.....</i> | 5 |
| 3) <i>Potentiels hydriques dans la plante.....</i> | 7 |
| <u>II FONCTIONNEMENT ET ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DE LA PLANTE.....</u> | 9 |
| 1) <i>Fonctionnement hydraulique</i> | 9 |
| a. <u>La théorie de la tension-cohésion</u> | 9 |
| b. <u>Les voies de circulation de l'eau dans les plantes.....</u> | 11 |
| 2) <i>Le paradigme de la nutrition des plantes : mourir de faim ou de soif ?</i> | 13 |
| 3) <i>Impacts de la sécheresse</i> | 15 |
| a. <u>Contexte de changements climatiques et impacts écologiques et économiques</u> | 15 |
| b. <u>Impacts sur la productivité et la survie</u> | 17 |
| 4) <i>La résistance à la sécheresse</i> | 19 |
| <u>III STRUCTURE ET FORMATION DU XYLEME ET DES PONCTUATIONS.....</u> | 27 |
| 1) <i>Structure du xylème et xylogénèse.....</i> | 27 |
| a. <u>Structure du xylème et variabilité interspécifique.....</u> | 27 |
| b. <u>Xylogénèse et mise en place des cellules conductrices</u> | 35 |
| 2) <i>Structure et synthèse des ponctuations</i> | 38 |
| a. <u>Contrôle génétique de l'organisation des ponctuations</u> | 39 |
| b. <u>Structure des ponctuations entre cellules conductrices</u> | 39 |
| c. <u>Composition des membranes de ponctuations</u> | 41 |
| d. <u>Variabilité structurelle des ponctuations</u> | 43 |
| e. <u>Tori et pseudo-tori chez les angiospermes</u> | 45 |
| f. <u>Ornementations des ponctuations d'angiospermes.....</u> | 49 |
| <u>IV PROPRIETES HYDRAULIQUES DU XYLEME ET EFFICIENCE DU TRANSPORT DE L'EAU</u> | 53 |
| 1) <i>Les variables hydrauliques</i> | 53 |
| 2) <i>Propriétés du xylème contrôlant l'efficacité hydraulique</i> | 53 |

| | |
|--|------------|
| a. <u>Structure du xylème et conductance hydraulique</u> | 53 |
| b. <u>Contrôle ionique de la conductance des vaisseaux</u> | 59 |
| <u>V VULNERABILITE A LA CAVITATION ET SECURITE DU TRANSPORT DE L'EAU</u> | 63 |
| 1) <i>Un paramètre clé de la résistance à la sécheresse</i> | 63 |
| 2) <i>Mécanismes de cavitation</i> | 63 |
| 3) <i>Techniques de mesures de la vulnérabilité à la cavitation</i> | 67 |
| 4) <i>Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation</i> | 69 |
| 5) <i>Résorption de l'embolie et fatigue de la cavitation</i> | 73 |
| 6) <i>Compromis entre résistance à la cavitation et les propriétés du bois</i> | 75 |
| 7) <i>Les ponctuations : structures clés de la vulnérabilité à la cavitation</i> | 77 |
| a. <u>Implication du nombre de ponctuations</u> | 77 |
| b. <u>Aspects qualitatifs des ponctuations chez les gymnospermes</u> | 79 |
| c. <u>Aspects qualitatifs des ponctuations chez les angiospermes</u> | 81 |
| <u>VI OBJECTIFS DE THESE</u> | 85 |
| RESULTATS | 93 |
| CHAPITRE 1 | 93 |
| MODELLING THE MECHANICAL BEHAVIOUR OF PIT MEMBRANES IN BORDERED PITS WITH RESPECT TO CAVITATION RESISTANCE IN ANGIOSPERMS | 95 |
| CHAPITRE 2 | 131 |
| PRODUCTION ET CARACTERISATION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES MODIFIES POUR LE METABOLISME DES PECTINES | 133 |
| <u>I INTRODUCTION : CHOIX DES GENES CANDIDATS</u> | 135 |
| 1) <i>Les pectines</i> | 135 |
| 2) <i>Pectine méthylesterase</i> | 139 |
| 3) <i>Endopolygalacturonase</i> | 141 |
| 4) <i>Apiose xylose synthase</i> | 143 |
| 5) <i>GDP-mannose 4-6 déhydratase</i> | 143 |
| <u>II PRODUCTION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES</u> | 145 |

| | |
|---|------------|
| 1) <i>Constructions des cassettes d'expression</i> | 145 |
| 2) <i>Transformation d'Agrobacterium tumefaciens</i> | 151 |
| 3) <i>Transformation de Populus tremula x alba</i> | 151 |
| <u>III CARACTERISATION DES LIGNEES TRANSGENIQUES</u> | 155 |
| 1) <i>Génotypage des lignées transformées</i> | 155 |
| a) <u>Matériel et Méthodes</u> | 155 |
| b) <u>Résultats</u> | 157 |
| 2) <i>Phénotypage des lignées transgéniques Pta4CL1 :: AnPG</i> | 157 |
| a) <u>Matériels et méthodes</u> | 157 |
| <i>Mesures de taux d'embolie native</i> | 159 |
| <i>Mesures de conductivités</i> | 159 |
| <i>Mesures de la vulnérabilité à la cavitation</i> | 161 |
| b) <u>Résultats</u> | 163 |
| <u>IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u> | 165 |
| | |
| UTILISATION DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA POUR PROSPECTER LES BASES GENETIQUES DE LA VULNERABILITE A LA CAVITATION | 171 |
| <i>Arabidopsis thaliana as a model species for xylem hydraulics: does size matter?</i> | |
| <i>Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies</i> | |
| | |
| DISCUSSION GENERALE | 174 |
| <u>I ROLE DE L'ULTRASTRUCTURE DE LA PONCTUATION</u> | 176 |
| 1) <i>Mise en évidence de l'importance des déformations</i> | 176 |
| 2) <i>Rôle de chacune des dimensions de la ponctuation</i> | 178 |
| 3) <i>Perspectives</i> | 182 |
| <u>II PROPRIETES INTRINSEQUES DE LA MEMBRANE</u> | 186 |
| 1) <i>Propriétés physiques</i> | 186 |
| 2) <i>Composition de la membrane</i> | 188 |
| <u>III BASES GENETIQUE DE LA VULNERABILITE A LA CAVITATION</u> | 192 |
| 1) <i>Pertinence de l'approche gène candidat</i> | 192 |
| 2) <i>Rôle des pectines et des polygalacturonases dans la vulnérabilité à la cavitation</i> | 196 |

| | |
|--|----------------|
| 3) <i>Perspectives</i> | 200 |
| <u>IV CONCLUSION GENERALE</u> | 204 |
| BIBLIOGRAPHIE | 208 |
| ANNEXES | 230 |

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

PROPRIETES HYDRIQUES DE LA PLANTE

Quelques propriétés de l'eau

Notions de potentiel hydrique

Potentiels hydriques dans la plante

FONCTIONNEMENT ET ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DE LA PLANTE

Fonctionnement hydraulique

Le paradigme de la nutrition des plantes : mourir de faim ou de soif ?

Impacts de la sécheresse

La résistance à la sécheresse

STRUCTURE ET FORMATION DU XYLEME ET DES PONCTUATIONS

Structure du xylème et xylogenèse

Structure et synthèse des ponctuations

PROPRIETES HYDRAULIQUES DU XYLEME ET EFFICIENCE DU TRANSPORT DE L'EAU

Les variables hydrauliques

Propriétés du xylème contrôlant l'efficacité hydraulique

VULNERABILITE A LA CAVITATION ET SECURITE DU TRANSPORT DE L'EAU

Un paramètre clé de la résistance à la sécheresse

Mécanismes de cavitation

Techniques de mesures de la vulnérabilité à la cavitation

Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation

Résorption de l'embolie et fatigue de la cavitation

Compromis entre résistance à la cavitation et les propriétés du bois

Les ponctuations : structures clés de la vulnérabilité à la cavitation

OBJECTIFS DE THESE

I PROPRIETES HYDRIQUES DE LA PLANTE

L'eau est un composé inorganique ubiquitaire et essentiel à la vie. Ses propriétés polaires et la petite taille de la molécule (18 Da) en font le milieu et le substrat de nombreuses réactions biochimiques de la cellule. Les liaisons hydrogènes des molécules d'eau participent à la solubilisation des molécules essentielles au fonctionnement de la cellule et conditionnent les propriétés thermodynamiques de l'eau qui joueront un rôle crucial dans le fonctionnement hydrique de la plante.

1) Quelques propriétés de l'eau

Les liaisons hydrogènes de l'eau sont à l'origine d'une valeur d'énergie nécessaire à la vaporisation d'une masse d'eau (enthalpie de vaporisation) extrêmement élevée. L'enthalpie de vaporisation de l'eau est de 2256 kJ.kg^{-1} . A titre de comparaison, l'enthalpie de l'éthanol est de 855 kJ.kg^{-1} , celle de l'éthylène est de 483 kJ.kg^{-1} et enfin celle de l'ammoniac est de 1391 kJ.kg^{-1} . L'eau nécessite ainsi une grande quantité d'énergie externe pour augmenter sa température. Pour la plante, la forte enthalpie de vaporisation de l'eau abaisse la température des organes lors de la transpiration et limite ainsi les hausses de température des organes.

D'autre part, les liaisons hydrogènes de l'eau sont à l'origine de propriétés d'adhésions, de cohésions et de tensions superficielles. Ces propriétés thermodynamiques interviennent dans l'état hydrique du sol, des organes et ainsi dans les transferts d'eau. La cohésion des molécules d'eau traduit la capacité des molécules d'eau à se lier entre elles. La force nécessaire à casser les liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau est telle que l'on considère que l'eau est incompressible. A titre d'illustration, la pression nécessaire pour faire varier de 1 % un volume d'eau est de 22 MPa et sa tension de rupture est de -25 MPa . De telles pressions ne sont pas présentes dans les végétaux ; on néglige donc la compressibilité de l'eau dans le cadre hydrique d'une plante. La forte cohésion des molécules est nécessaire aux transferts d'eau dans la plante.

Les propriétés d'adhésions traduisent la capacité des molécules d'eau à se lier à un solide comme les particules du sol ou les parois des cellules. Les forces d'adhésions de l'eau avec les particules du sol sont une résistance à l'absorption et influencent la masse d'eau disponible pour la plante. Ces forces dépendent de la nature du sol.

L'énergie de liaison entre molécules d'eau génère une tension à l'interface eau/air. Cette tension superficielle conditionne la forme de l'interface et induit aussi une tension dans l'eau. La tension de surface de l'eau au niveau du site d'évaporation des feuilles génère les forces nécessaires à la montée de l'eau dans tout le système vasculaire.

2) Notions de potentiel hydrique

Le potentiel hydrique représente le travail à exercer sur une masse d'eau d'un système pour la faire passer d'un état de liaison à un état libre. Il traduit l'affinité de l'eau libre pour le système considéré ou son degré de liaison à ce système. Le potentiel hydrique peut être mesuré pour une cellule, un organe, ou encore une plante entière. Pour évaluer le statut hydrique des plantes, les écophysiologistes emploient communément le potentiel hydrique. Il a la dimension d'une pression et il est généralement exprimé en bars ou en Pascal (10 bar = 1 MPa = 9.87 atmosphère = 7500.64 torr). Dans une plante, le potentiel hydrique (ψ) peut se traduire par l'équation :

$$\Psi = \psi_p + \psi_\pi + \psi_m + \psi_g$$

$-\psi_p$, le **potentiel hydrostatique** représente l'effet de la pression, soit une composante mécanique du potentiel hydrique. A l'échelle d'une cellule, on peut l'assimiler à la pression de turgescence. Dans une cellule turgescence, ψ_p est positif et a une valeur comprise entre 3 et 10 bars. Dans une cellule plasmolysée, il est nul. Dans le xylème, il est négatif (Nobel, 1999).

$-\psi_\pi$, le **potentiel osmotique**. Il traduit la force de rétention des solutés pour l'eau et il est contrôlé par la concentration de ces solutés. Il représente une composante électrochimique du potentiel hydrique. Si la concentration augmente, la pression osmotique augmente et ψ_π diminue. Le potentiel osmotique est classiquement calculé par l'équation de Van't Hoff :

$$\psi_\pi = -RTC$$

avec R la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T la température en Kelvin (K) et C la concentration molaire totale. Dans une cellule, ψ_π est négatif et a une valeur comprise entre -10 et -20 bars (Nobel, 1999).

$-\psi_m$, le **potentiel matriciel**. Il caractérise les forces de tensions superficielles (capillarité) d'un milieu. Il est considéré comme négligeable pour un tissu vivant car assimilé à ψ_π . Le potentiel matriciel sera surtout d'importance pour le potentiel hydrique d'un sol.

$-\psi_g$, le **potentiel gravitationnel** est la pression générée par une différence de hauteur d'eau. Ainsi, une colonne d'eau de 10 m de haut applique une pression de 1 bar. En dessous de cette hauteur, ou pour le cas d'une cellule, ψ_g est généralement négligé.

A l'échelle d'une cellule végétale ou d'un tissu, le potentiel hydrique est généralement estimé par l'addition des potentiels hydrostatique et osmotique. Il est négatif et diminue en condition de plasmolyse.

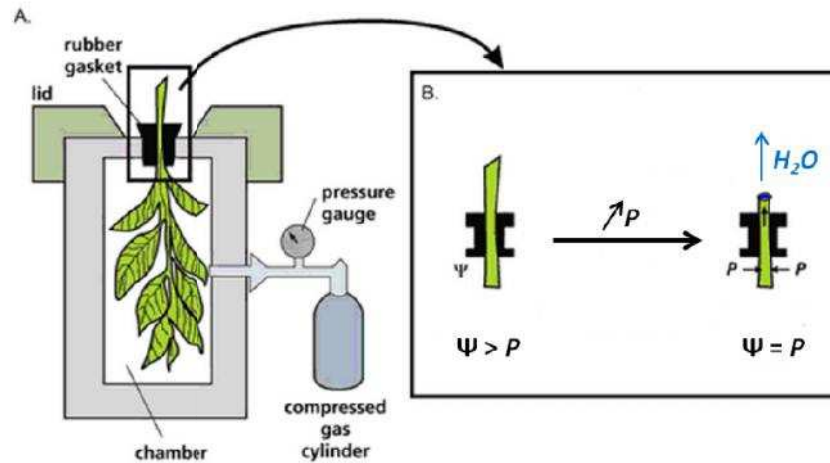


Figure 1 : schéma d'une chambre à pression utilisée pour mesurer le potentiel hydrique d'un organe. L'organe est placé dans une chambre qui est reliée à une source d'air comprimé (A). Seule la section de l'organe dépasse de la chambre. La pression au sein de la chambre est augmentée et un manomètre indique son évolution. Lorsque la pression appliquée atteint la valeur du potentiel hydrique de l'organe, il est à équilibre de pression avec l'enceinte de la chambre et, l'eau est alors poussée hors de ses tissus via la section restée à pression atmosphérique (B). D'après (Lambers et al., 2008).

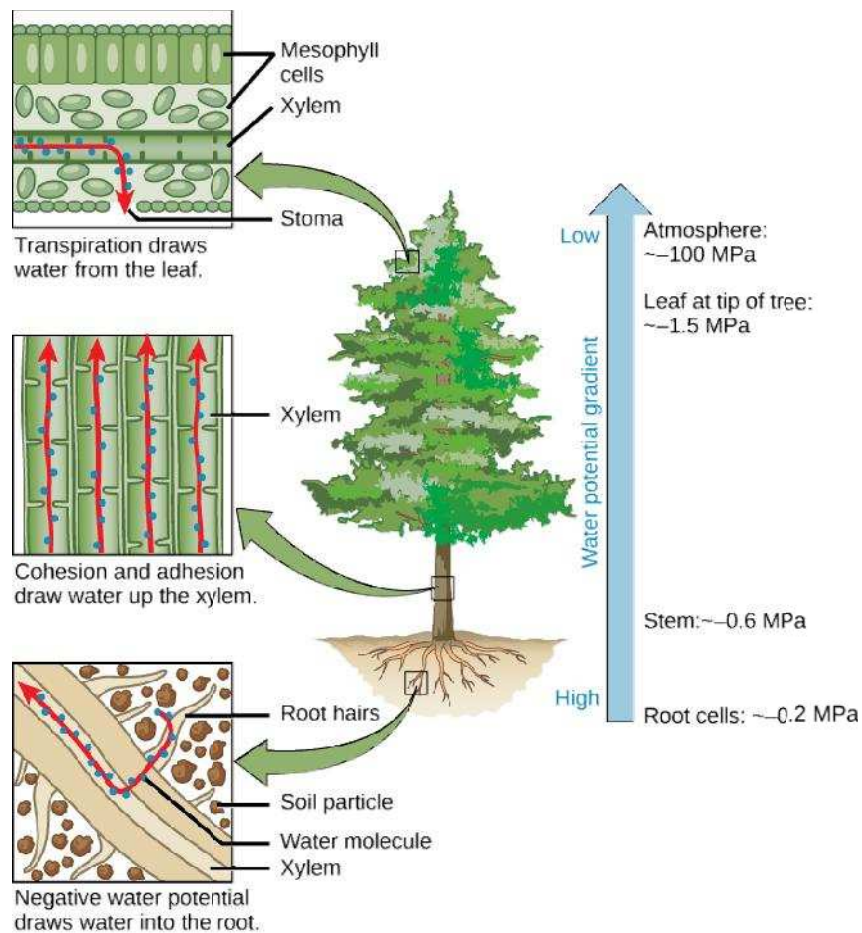


Figure 2 : Continuum sol-plante-atmosphère. L'eau se déplace selon des potentiels hydriques décroissants, depuis les racines jusqu'aux feuilles, en empruntant les vaisseaux du xylème pour l'essentiel du trajet. ((ASC), 2013)

3) Potentiels hydriques dans la plante

Le potentiel hydrique d'une cellule est mesuré par une sonde à pression (Hüsken et al., 1978; Shackel and Brinckmann, 1985). A l'échelle d'un organe, le psychromètre et la chambre à pression (Figure 1) sont classiquement utilisés (Turner, 1981).

Le potentiel hydrique d'une plante est une valeur dynamique qui varie au cours de la journée, selon l'organe, mais aussi selon les conditions du milieu et selon l'espèce. La plante représente un système thermodynamiquement ouvert avec le sol et l'air. L'eau transite du sol jusqu'à l'atmosphère, selon un continuum sol-plante-atmosphère et dans le sens des potentiels hydriques décroissants (Figure 2, Table 1) (Nobel, 1999). Le potentiel hydrique de l'air (Ψ_{air}) est fonction de l'humidité relative du milieu comme montré dans l'équation suivante (Kramer and Boyer, 1995) :

$$\Psi_{air} = \frac{RT}{\bar{V}} \ln\left(\frac{e}{e_0}\right)$$

R est la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin, \bar{V} le volume partiel molal de l'eau ($1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$), et $\frac{e}{e_0}$ l'humidité relative de l'air. La différence de potentiel hydrique entre l'air et le sol (cf Table 1) permet un transport à travers la plante dont le moteur est la transpiration (Table 1).

- Le potentiel hydrique foliaire ($\Psi_{feuille}$) caractérise l'état hydrique moyen d'une feuille. Il varie au cours de la journée en fonction du taux de transpiration (Figure 3a) avec deux valeurs extrêmes :

- Le potentiel hydrique de base (Ψ_{max}) correspond à la valeur maximale. Ce potentiel est mesuré en fin de nuit, lorsqu'il est considéré en équilibre avec celui du sol après une longue période sans transpiration. Ce potentiel est alors proche du potentiel hydrique du sol et constitue un indicateur de celui-ci (Figure 3a, c).

- Le potentiel hydrique minimum (Ψ_{min}) correspond à la valeur minimale de $\Psi_{feuille}$ atteinte, généralement autour du midi solaire lorsque la demande évaporative est la plus forte.

Le continuum sol-plante-atmosphère implique que le potentiel hydrique d'une plante varie en fonction des potentiels hydriques du sol (Figure 3c) et de l'atmosphère (Figure 3b). Le déficit en pression de vapeur d'eau (VPD ou « vapor pressure deficit ») traduit le statut hydrique de l'air et relatif par rapport à une situation de saturation d'air (« saturated vapor pressure » ou SVP) selon l'équation :

$$VPD = \frac{100 - \frac{e}{e_0}}{100} SVP$$

Tableau 1 : Valeurs représentatives de potentiels hydriques et ses composantes à différents points du continuum sol-plant-atmosphère . D'après (Nobel, 1999)

| | POTENTIEL HYDRIQUE | Potentiel hydrostatique | Potentiel Osmotique | Potentiel gravitationnel | Potentiel matriciel | Potentiel hydrique en phase gazeuse |
|-----------|-----------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|--|
| Air | -95.2 | - | - | - | - | -95.2 |
| HR = 50 % | | | | | | |
| FEUILLE | -0.8 | 0.2 | -1.1 | 0.1 | - | - |
| TIGE | -0.7 | -0.7 | -0.1 | 0.1 | - | - |
| RACINE | -0.6 | 0.5 | -1.1 | - | - | - |
| SOL | -0.3 | - | -0.1 | - | -0.2 | - |

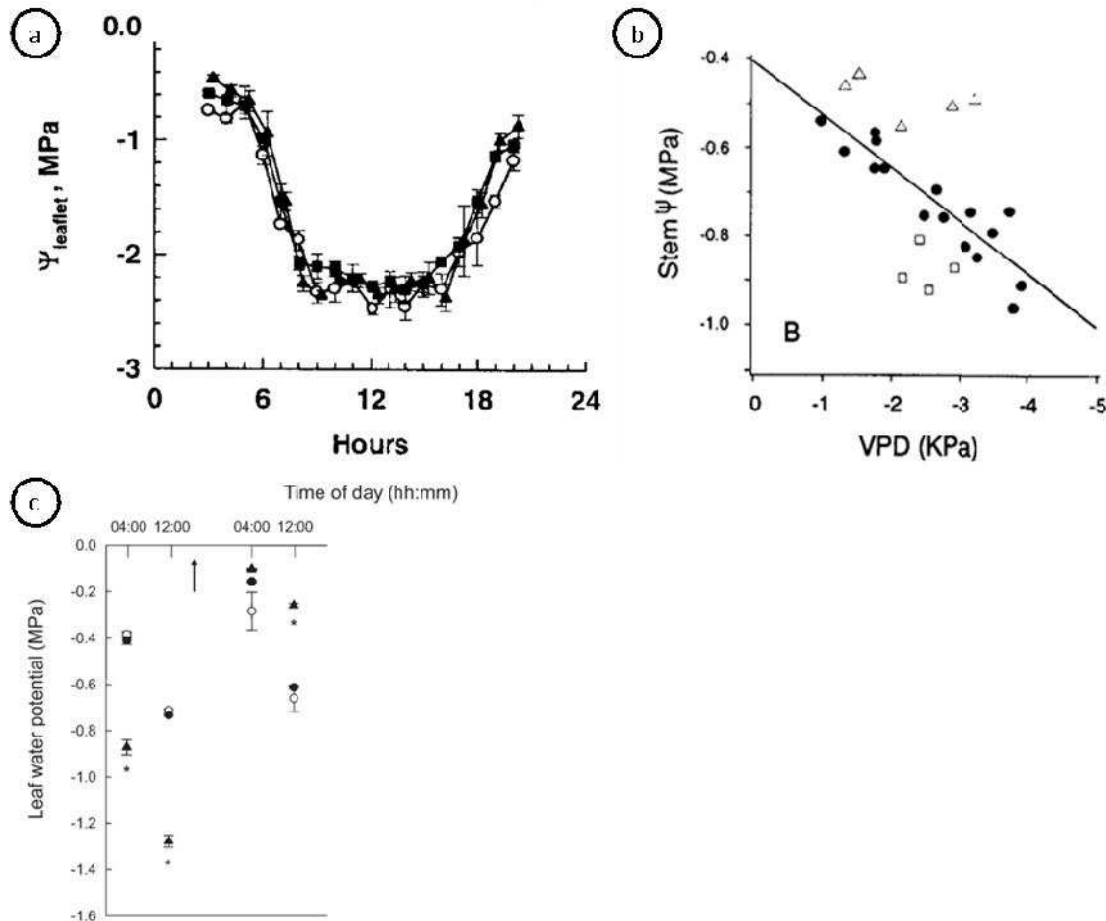


Figure 3 : Exemples de valeurs de potentiels hydriques *in planta*. (a) Variations diurnales de potentiels hydriques foliaires chez *Fraxinus excelsior* (Cochard et al., 1997). Les symboles représentent des arbres différents. (b) Variations de potentiels hydriques de tige chez *Prunus domestica* L. en fonction du déficit de pression de vapeur (VPD) (McCutchan and Shackel, 1992). Les symboles représentent des dates de prélèvement différentes dans la saison. (c) Variation de Ψ_{max} et Ψ_{min} dans des feuilles de *Populus tremula x alba* cultivés sous différents régimes hydriques du sol (bien irrigués: cercle blanc, stress hydrique modéré : cercle noir, stress hydrique sévère : triangle noir (Awad et al., 2010)). Ψ_{max} est mesuré à 4

H, Ψ_{\min} est mesuré à 12 H. Les plantes stressées présentent des potentiels hydriques plus négatifs. Après un arrosage (flèche), les potentiels hydriques augmentent.

II FONCTIONNEMENT ET ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DE LA PLANTE

L'eau a un rôle central dans la croissance, la photosynthèse et le transport des substances organiques et inorganiques. Cinq à 10 % de l'eau absorbée par les racines est affectée aux fonctions de photosynthèse et de croissance (Cruziat et al., 2001). La majorité est évacuée par la transpiration. A titre d'exemple, un chêne transpire quotidiennement près de 200 litres d'eau et une hêtraie d'un hectare consomme de 2000 à 5000 tonnes d'eau par an, et elle en restitue 2000 par évaporation (ONF). Le moteur de ce transfert est l'énergie solaire car elle apporte la quantité d'énergie nécessaire à l'eau, arrivée aux feuilles, pour passer de l'état liquide à gazeux en cassant les liaisons hydrogènes présentes à l'interface eau/air. Par conséquent, la transpiration constitue une force motrice pour l'ascension de la sève xylémienne, en plus de son rôle de régulation thermique des feuilles.

1) Fonctionnement hydraulique

L'ascension de la sève dans la plante est expliquée par la théorie de la tension-cohésion proposé par H. Dixon en 1914. Elle dépend de propriétés thermodynamiques de l'eau.

a. La théorie de la tension-cohésion

L'évaporation crée un déficit hydrique foliaire. La différence de potentiel avec le pétiole et le xylème du rameau porteur engendre un flux d'eau vers la feuille. Celui-ci abaisse à son tour le potentiel hydrique du pétiole, du rameau, et ainsi de suite jusqu'aux racines, voire au sol. Il existe donc une continuité hydraulique à travers toute la plante depuis les parois des cellules foliaires, où l'évaporation a lieu, jusqu'aux particules du sol. Cette continuité hydraulique est réalisée au sein de colonnes d'eau qui sont maintenues par les forces de cohésion liant entre elles les molécules d'eau. Lorsque l'eau atteint les feuilles, elle passe en phase gazeuse. En raison de la haute tension superficielle de l'interface eau/air, l'évaporation de l'eau induit une grande tension dans l'eau qui est à l'origine du transport dans toute la plante. La tension de surface générée est définie par l'équation de Young-Laplace :

$$\Delta P = -\frac{2\gamma}{r}$$

avec ΔP la tension générée pour r le rayon du ménisque formé à l'interface. γ représente la tension superficielle de l'interface eau/air ($73.10^{-3} \text{ J.m}^{-2}$). L'ascension de la sève est permise par la microscopique taille des ménisques formés sur la paroi des cellules du limbe foliaire. Ainsi, si on considère une porosité de la paroi cellulaire de 10-20 nm, la pression générée est de -15 à -7 MPa. Cette tension négative est le moteur du transfert d'eau à travers la plante. Ce phénomène est décrit

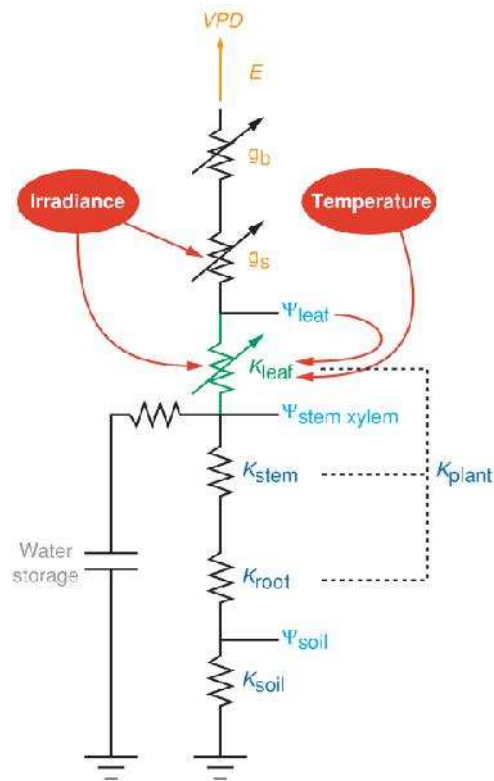


Figure 4 : schéma du fonctionnement hydraulique du continuum sol-plante-atmosphère selon l'analogie à la loi d'Ohm. Chaque compartiment possède une résistance au transfert d'eau avec des potentiels hydriques décroissants. K_{soil} , K_{root} , K_{stem} , K_{leaf} et K_{plant} représentent respectivement les conductances hydrauliques du sol, des racines, des tiges, des feuilles et de la plante. Ψ_{soil} , $\Psi_{stem\ xylem}$, Ψ_{leaf} représentent respectivement les potentiels hydriques du sol, de la tige et de la feuille. g_s , g_b , E et VPD représentent respectivement la conductance stomatique, la conductance de la couche limite, le taux de transpiration et le déficit de pression de vapeur (Sack and Holbrook, 2006). L'effet du microclimat (irradiance et température) sur g_s et K_{leaf} est montré par des flèches rouges. K_{leaf} , g_s et g_b sont donc représentés comme des conductances variables. Un flux d'eau vers les feuilles peut provenir de stockage des tissus environnants (water storage).

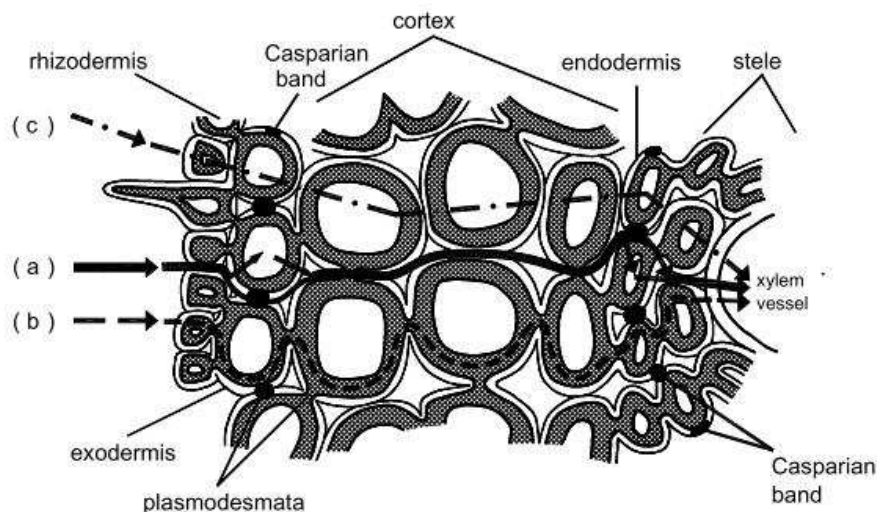


Figure 5 : Voies de transport de l'eau et des ions dans les racines. (a) voie apoplasmique, (b) voie symplasmique, (c) voie transmembranaire. (Steudle, 2000).

par la théorie de la tension-cohésion (Dixon, 1914; Zimmermann, 1983; Cochard and Cruiziat, 2001). Ce transport est passif et son moteur présente un coût énergétique nul pour les végétaux puisqu'il dépend de l'énergie solaire. Les flux d'eau entre le sol, les différentes parties de la plante et l'atmosphère dépendent à la fois des résistances au transfert d'eau et des différences de potentiels hydriques selon une relation analogue à la loi d'Ohm ($\Delta U=RI$) (Cruiziat et al., 2001) :

$$\Delta\Psi = R \times Flux \text{ et } K = \frac{1}{R}$$

avec $\Delta\Psi$ la différence de potentiel hydrique entre 2 points, et R la résistance des éléments conducteurs de la plante au transfert de l'eau entre ces deux points. K est la conductance, l'inverse de la résistance. Le flux d'eau dans la plante est donc soumis à une série de résistances propres aux organes traversés (Figure 4).

b. Les voies de circulation de l'eau dans les plantes

Si les racines sont le siège de l'absorption de l'eau, elles représentent aussi l'interface de la plante avec le sol dans lequel elles puisent les éléments minéraux tels que l'azote, le potassium et le phosphore. Dans le sol, le transport de l'eau est principalement réalisé par flux de masse. En revanche, lorsque l'eau arrive au contact des racines, l'eau est transporté radialement par plusieurs voies de passage afin d'atteindre le système vasculaire de la plante (Figure 5) (Steudle, 2000). Ces voies sont l'apoplasme, le symplasma et le transport transmembranaire. Lors du transport apoplasmique, l'eau chemine exclusivement à travers les parois des cellules et ne traverse aucune membrane cellulaire. Lors du transport symplasmique, l'eau circule dans les cytoplasmes en empruntant les plasmodesmes qui sont des zones d'interruption des parois et membranes entre les cellules. Lors du transport transmembranaire, l'eau circule aussi à l'intérieur des cellules mais traverse les membranes cellulaires via des protéines transmembranaires, de type canaux, spécialisées dans le transport des molécules d'eau : les aquaporines (Javot et al., 2003). Le transport radial de l'eau dans la racine implique de traverser l'endoderme. Ce dernier présente des épaissements pariétaux hydrophobes, le cadre de Caspary, qui forcent un passage transcellulaire au niveau de ce tissu. Ce passage permet ainsi le contrôle des substances absorbées avant qu'elles soient transportées par le xylème.

Le transfert de l'eau des racines jusqu'aux feuilles est réalisé au sein du xylème, dans des cellules mortes formant des vaisseaux ou des trachéides qui se présentent comme de fins capillaires (10 à 500 μm) (Cruiziat et al., 2001) contenant des colonnes d'eau sous tensions (Figure 6). Ce transport axial à longue distance est donc apoplasmique. Les propriétés hydrauliques du xylème sont au cœur de ce travail de thèse et seront développées dans les chapitres suivants.

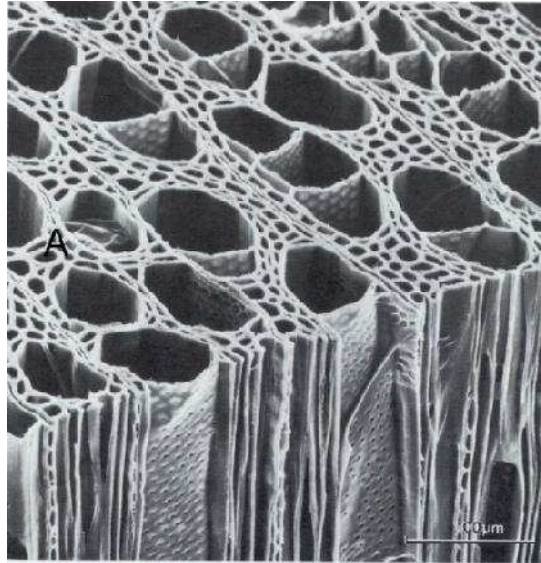


Figure 6 : Xylème de *Populus grandidata* observé en MEB. Le xylème est un tissu spécialisé dans le transport de l'eau. Les vaisseaux forment des conduits dans lesquels circule la sève. (Tyree and Zimmermann, 2002).

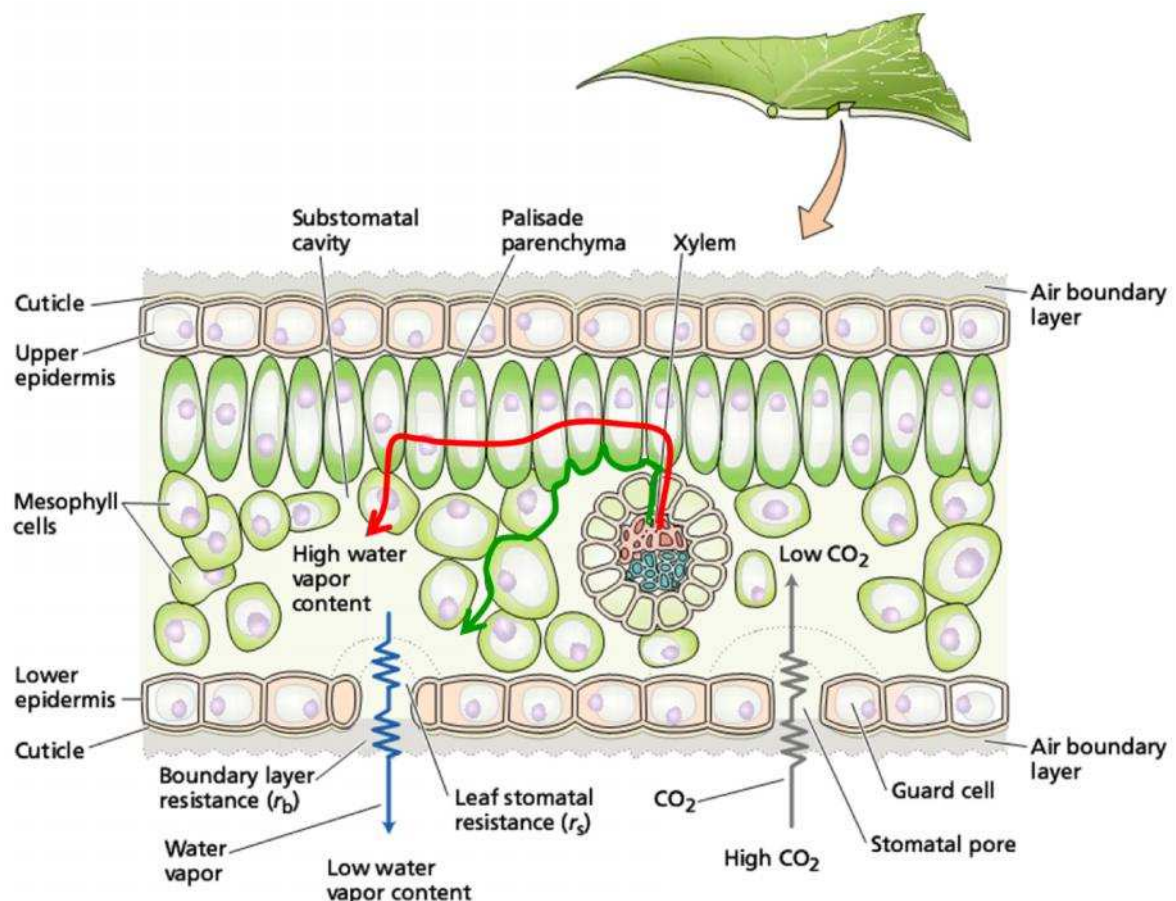


Figure 7 : Transport radial de l'eau dans la feuille. L'eau passe du xylème aux cellules du mésophylle par les voies symplasmique et transcellulaire (flèche rouge) et apoplasmique (flèche verte). L'eau s'évapore ensuite au niveau des parois des cellules de la chambre sous-stomatique. L'eau sous forme gazeuse diffuse à travers les stomates et la couche limite (flèche bleue). Le CO_2 diffuse dans la direction opposée (flèche grise). Le stomate est constitué de deux cellules de garde (« guard cell ») entourant l'ostiole (« stomatal pore »). (Taiz and Zeiger, 2010)

Le xylème vascularise l'ensemble de la plante et achemine l'eau au niveau des feuilles par les nervures (Figure 7). A ce niveau, le trajet vasculaire est interrompu et l'eau est transportée radialement par des voies apoplastique, symplastique et transcellulaire jusqu'aux chambres sous-stomatiques (Figure 7). La conductance des feuilles est caractérisée par une résistance propre au xylème mais aussi des résistances propres au mésophylle foliaire, aux stomates et à la couche limite:

$$R_{\text{feuille}} = R_{\text{xylème}} + R_{\text{mésophylle}} + R_{\text{stomates}} + R_{\text{couche limite}}$$

La résistance de la feuille représente une part substantielle de la résistance totale d'une plante ($\geq 30\%$) et la proportion de la résistance du xylème dans la résistance totale de la feuille sera très variable en fonction des espèces (26-89 %) (Sack and Holbrook, 2006).

Au niveau des chambres sous-stomatiques, l'eau passe en phase gazeuse. La vapeur d'eau diffuse ensuite au niveau de l'ostiole des stomates. Les stomates sont des ouvertures dans l'épiderme permettant les échanges gazeux (Figure 7). Un stomate est constitué d'un ostiole, qui est l'ouverture du stomate, et de deux cellules de garde dont la turgescence ou la plasmolyse contrôle l'ouverture du stomate. La fermeture des stomates est un phénomène modulé par des facteurs externes comme l'éclairement, la température et humidité de l'air, la concentration en CO_2 atmosphérique, la qualité de la lumière (Kramer and Boyer, 1995; Sack and Holbrook, 2006; Brodribb and McAdam, 2011). Cette fermeture est contrôlée en partie via l'acide abscissique (Brodribb and Holbrook, 2003; Beguerisse-Diaz et al., 2012). Deux résistances s'opposent à la diffusion de l'eau dans l'atmosphère sous forme gazeuse: la résistance stomatique et celle de la couche limite. La couche limite correspond à la couche d'air non agitée en contact avec la feuille, qui est plus ou moins saturée en eau. D'après la loi de Fick, le taux d'évaporation (E) est fonction de la conductance stomatique (g_s) et de la conductance de la couche limite (g_b) (Sack and Holbrook, 2006).

$$E = ([H_2O]_{\text{feuille}} - [H_2O]_{\text{air}}) \times (g_s + g_b)$$

2) Le paradigme de la nutrition des plantes : mourir de faim ou de soif ?

Si les stomates offrent une résistance aux échanges hydriques de la plante avec l'air ambiant, elles offrent aussi une résistance à l'assimilation du carbone atmosphérique (Figure 7). Ainsi, l'état d'ouverture des stomates est un compromis entre la perte d'eau et l'assimilation du CO_2 de l'atmosphère (Leuning, 1995). Pour absorber du carbone, les plantes perdent nécessairement de l'eau et ce, en plus grande quantité. Cette plus grande perte d'eau est causée par les gradients de concentration en eau qui sont plus forts entre la feuille et l'atmosphère que les gradients de CO_2 et aussi par le fait que la molécule de CO_2 présente une taille plus importante que l'eau (Farquhar et al., 1980).

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE, Water Use Efficiency) traduit ce compromis de la nutrition des plantes : c'est le quotient du gain net en matière sèche (MS), sur une période de temps donnée, divisé par la perte d'eau (mH_2O). A l'échelle de la feuille, elle est définie directement et de façon instantanée comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A , $\mu mol CO_2 m^{-2}.s^{-1}$) et la transpiration (E , $mmol H_2O m^{-2}.s^{-1}$) (Parkhurst, 1994). Les ordres de grandeur de la WUE pour les plantes aux métabolismes en C3, C4 ou CAM sont respectivement de 0.5-1.5, 1.0-2.0, ou 4-10 $mmol CO_2 (mol H_2O)^{-1}$ (Szarek and Ting, 1975; Nobel, 1991). La séparation dans l'espace et dans le temps des phases photochimiques et chimiques de la photosynthèse permet aux plantes C4 et CAM de limiter leurs pertes en eau. Lors d'épisode de sécheresse, la plante se retrouve donc face au dilemme de fermer ses stomates pour limiter ses pertes en eau ou de les ouvrir afin d'assimiler du CO_2 . Si la plante ferme ses stomates, elle épuise ses molécules carbonées issues des réserves ou de l'autophagie afin de maintenir ses cellules en vie (respiration de maintenance et défense). L'alternative revient à maintenir les stomates ouverts pour maintenir un apport en carbone nécessaire à son métabolisme au risque de perdre son intégrité hydraulique (McDowell et al., 2008). L'amélioration de l'efficacité de l'eau est donc actuellement au cœur de programmes de recherches visant à améliorer la productivité des cultures en situation de stress hydrique (Amigues et al., 2006).

3) Impacts de la sécheresse

Pour faire face aux nouveaux défis agronomiques que représentent les changements globaux, la compréhension des impacts physiologiques de la sécheresse est cruciale (Amigues et al., 2006). Les effets de la sécheresse portent sur la productivité des plantes mais aussi sur leur survie. Ce dernier point est d'autant plus important pour les espèces longévives.

a. Contexte de changements climatiques et impacts écologiques et économiques

Le rapport du GIEC (IPPC, Groupe Intergouvernemental d'Expert sur l'évolution du Climat) prévoit une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes de sécheresse dans un grand nombre de régions du monde, notamment l'Europe (GIEC, 2007). A l'échelle de la France, le siècle dernier a déjà pu observer une augmentation de la fréquence de ces épisodes. Ainsi, si la sécheresse de 1976 avait été vécue comme un événement exceptionnel, on note depuis le début des années 1990 une augmentation du nombre des épisodes de sécheresse, avec des cas extrêmes comme celles de 2003 et 2005. De septembre 2004 à septembre 2005, une grande partie du territoire a connu une pluviométrie inférieure d'un tiers à la moyenne des 50 dernières années (Amigues et al., 2006). De telles sécheresses ont des répercussions importantes sur les rendements agricoles. A titre d'exemple, en France, la sécheresse de 2003 a conduit à des pertes de rendement de 10-30% sur le blé, 10 à 55%

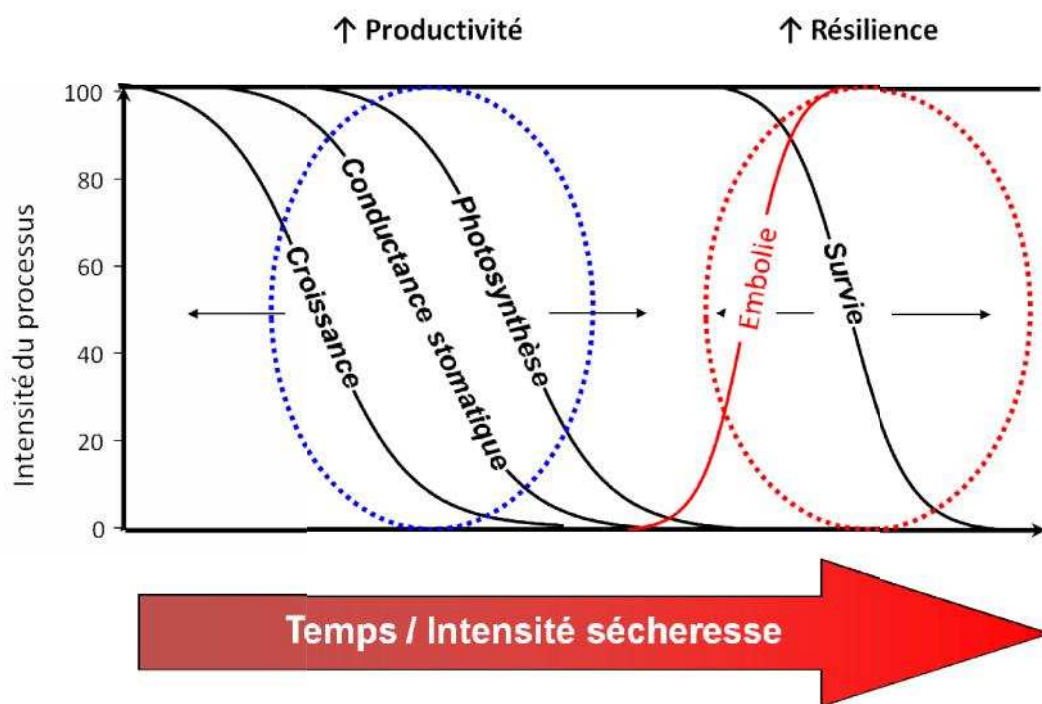


Figure 8 : Processus physiologiques affectés successivement lors d'un épisode de sécheresse. En fonction de son intensité et de sa durée, la sécheresse affecte la productivité de la plante (encadré bleu) en diminuant la croissance, la conductance stomatique et la photosynthèse. A terme, elle affectera aussi sa survie (encadré rouge).

sur le maïs, 5 à 20 % sur le tournesol et 14 à 37 % sur le sorgho (Amigues et al., 2006). Ces pertes de rendement ont évidemment eu des répercussions économiques très importantes. Dans le cas des plantes annuelles utilisées en grande culture, la sécheresse va induire une perte de productivité qui conduit à une diminution des rendements (Gaufichon and Prioul, 2010). De plus, ce stress tend à accélérer les phénomènes de sénescence. En effet, les espèces annuelles tendent à avoir une stratégie d'évitement de la sécheresse qui consiste à raccourcir le cycle de développement et à produire rapidement des graines mais en faible rendement.

Dans le cas des plantes pérennes, (production fruitière et forestière), aux problèmes de pertes de productivités annuelles (Ciais et al., 2005) s'ajoute le problème de mortalité (Bréda et al., 2006; Allen et al., 2010). A l'échelle mondiale, on a pu constater des dépérissements forestiers importants causés par des épisodes de sécheresse (Bigler et al., 2007; Allen, 2009; Allen et al., 2010), et notamment en Europe (Ciais et al., 2005; Bréda et al., 2006; Allen et al., 2010). Ces pertes ont des conséquences économiques et écologiques. C'est pourquoi il devient crucial de comprendre les mécanismes de résistance à la sécheresse des arbres afin de prédire le comportement des populations naturelles et de rechercher des génotypes ou conditions culturales adaptées aux conditions climatiques futures. Si ces populations peuvent présenter une certaine adaptabilité face à la sécheresse, leurs aires de répartition peuvent néanmoins être modifiées (Nicotra et al., 2010). La mortalité des populations forestières présente de sérieuses conséquences sur le climat local et la biodiversité (Bréda et al., 2006; Dirmeyer et al., 2006; McDowell et al., 2008). La question de la biodiversité est essentielle à notre époque car elle représente des ressources génétiques utiles pour l'adaptation des activités humaines aux changements globaux. Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur les mécanismes de résistance des arbres à la sécheresse.

b. Impacts sur la productivité et la survie

Une sécheresse peut avoir une composante édaphique qui se traduit par une chute de potentiel hydrique du sol mais aussi une composante atmosphérique. Généralement, sécheresses édaphique et atmosphérique sont simultanées et consécutives à un déficit de précipitation. Les impacts d'une sécheresse sont fonction de son intensité et de sa durée, ainsi que de l'espèce concernée et de ses processus de réponse. La compréhension de la succession temporelle des événements que subit un arbre soumis à la sécheresse est nécessaire pour appréhender ce phénomène et orienter les choix d'optimisation de la productivité et/ou de la résilience des arbres (Figure 8).

La perception de la chute de potentiel hydrique de la plante inhérente à la sécheresse initie une cascade de changements physiologiques qui diminuent sa productivité (Figure 8). Ainsi, la plante présente une diminution de croissance. Ensuite, la fermeture des stomates cause une élévation

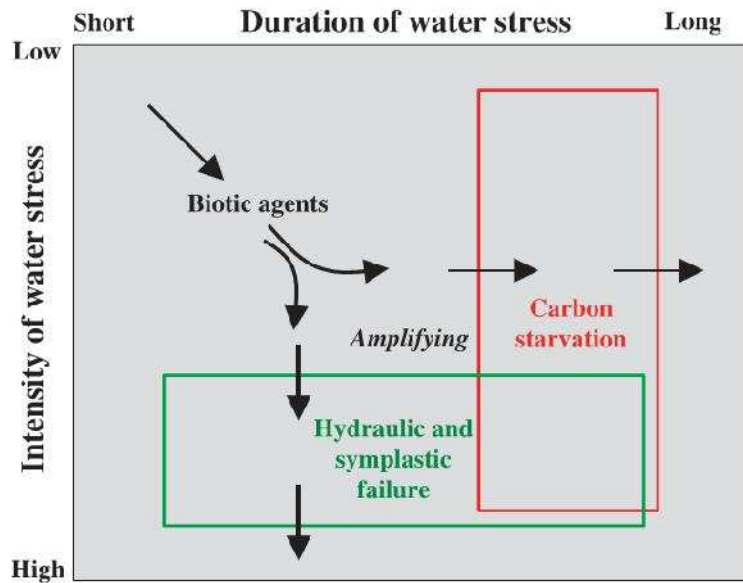


Figure 9 : Relations théoriques entre la durée et l'intensité de la sécheresse et les 3 principales causes de mortalité des arbres. Le manque de carbone semblerait être impactant pour des sécheresses prolongées car elles affecteraient les réserves de la plante, alors que le dysfonctionnement hydraulique surviendrait davantage lors de sécheresses intenses. L'effet des agents biotiques tels que les insectes et les pathogènes peut amplifier ou être favorisé par les deux premières causes. (McDowell et al., 2008)

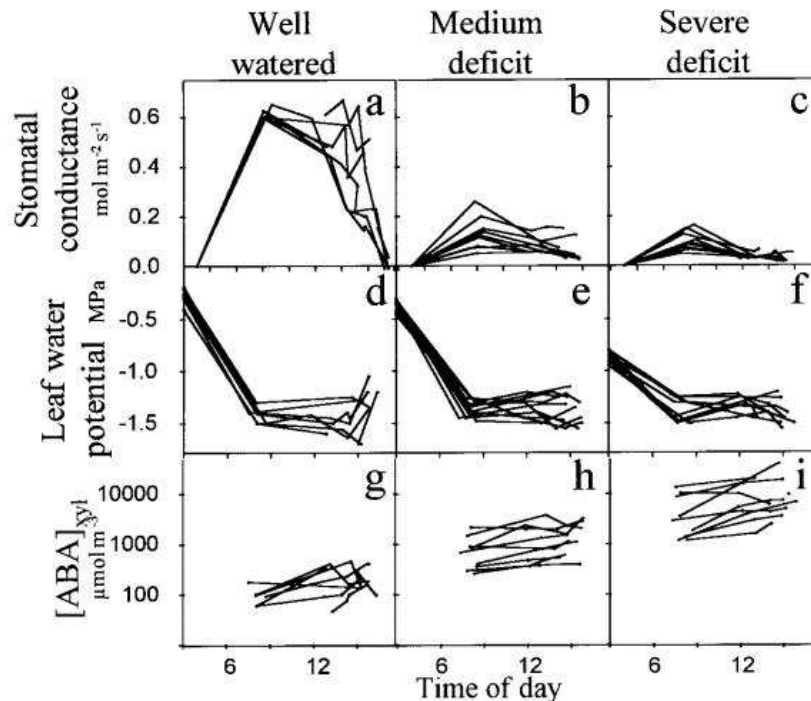


Figure 10 : Comportement journalier typique d'une plante isohydrique : le peuplier (*Populus euramericana*). Le stress hydrique induit rapidement une fermeture des stomates, et ainsi une diminution de la conductance stomatique. Cette conductance stomatique peut être corrélée à une augmentation de la concentration en ABA dans la sève xylémienne. Le potentiel hydrique en phase diurnale est le même quelque soit l'intensité du stress. Chaque ligne correspond à un individu. (Tardieu and Simonneau, 1998).

de la température foliaire et une diminution de l'activité de la photosynthèse (McDowell et al., 2008; Shao et al., 2008; McDowell, 2011; Hartmann et al., 2013). La plante aura donc une croissance moindre, une biomasse plus faible et une production de semence plus faible (Tardieu and Simonneau, 1998). Dans des cas de sécheresse de faible durée, ces conséquences physiologiques peuvent être réversibles et non létales.

Lorsque les effets de la sécheresse sur la survie sont analysés, il est important de ne pas les limiter à sa seule composante hydraulique et de prendre en compte ses conséquences multiples. Actuellement, il y a un débat sur les causes des mortalités consécutives à une sécheresse. En effet la perte d'intégrité hydraulique ne serait pas la seule cause de mortalité. Si un contrôle stomatique limite les pertes en eau, une l'assimilation en CO₂ insuffisante aurait aussi un impact fort sur la survie de la plante (Hartmann et al., 2013). Hartmann et al. (2003) ont néanmoins montré que la perte d'intégrité hydraulique serait plus impactante pour la survie chez l'épicéa. D'après McDowell et al. (2008), une sécheresse intense conduirait préférablement à un dysfonctionnement hydraulique alors qu'une sécheresse prolongée conduirait plus à la mort des individus par une assimilation insuffisante (Figure 9). De plus, la diminution de carbone assimilé et la perte d'intégrité hydraulique engendrent une sensibilité accrue des individus aux insectes et pathogènes, autres causes de mortalité forestière (McDowell et al., 2008). Ce travail de thèse s'inscrit pleinement dans les travaux de recherche de l'équipe HYDRO du PIAF qui s'intéresse au fonctionnement hydraulique des arbres en lien avec la sécheresse. Par la suite, nous ne détaillerons donc que les effets de la sécheresse sur la composante hydraulique.

En situation de sécheresse, les forces de tension présentes dans le xylème augmentent avec la diminution du potentiel hydrique du sol et/ou du potentiel atmosphérique (Tyree and Sperry, 1989; Brodribb and Cochard, 2009). Au-delà d'une certaine tension, il y a une cassure de la colonne d'eau, une entrée d'air et les vaisseaux sont alors embolisés (Tyree and Sperry, 1989; Cruiziat et al., 2001). L'embolie cause la perte d'intégrité hydraulique du xylème. Elle diminue la conductance des tiges et limite fortement l'approvisionnement en eau des feuilles. Ces organes expérimentent alors une chute de potentiel hydrique se traduisant par un flétrissement des tissus, puis la mort de l'organe, voire dans des conditions extrêmes, la mort de l'individu (McDowell et al., 2008).

4) La résistance à la sécheresse

Afin de piloter les programmes d'amélioration génétique et les pratiques culturales, il est nécessaire d'intégrer les échelles moléculaires, physiologiques et écologiques de la résistance des arbres à la sécheresse (Shao et al., 2008; Mason et al., 2012). Pour résister à la sécheresse, les arbres présentent des comportements physiologiques d'évitement ou de tolérance.

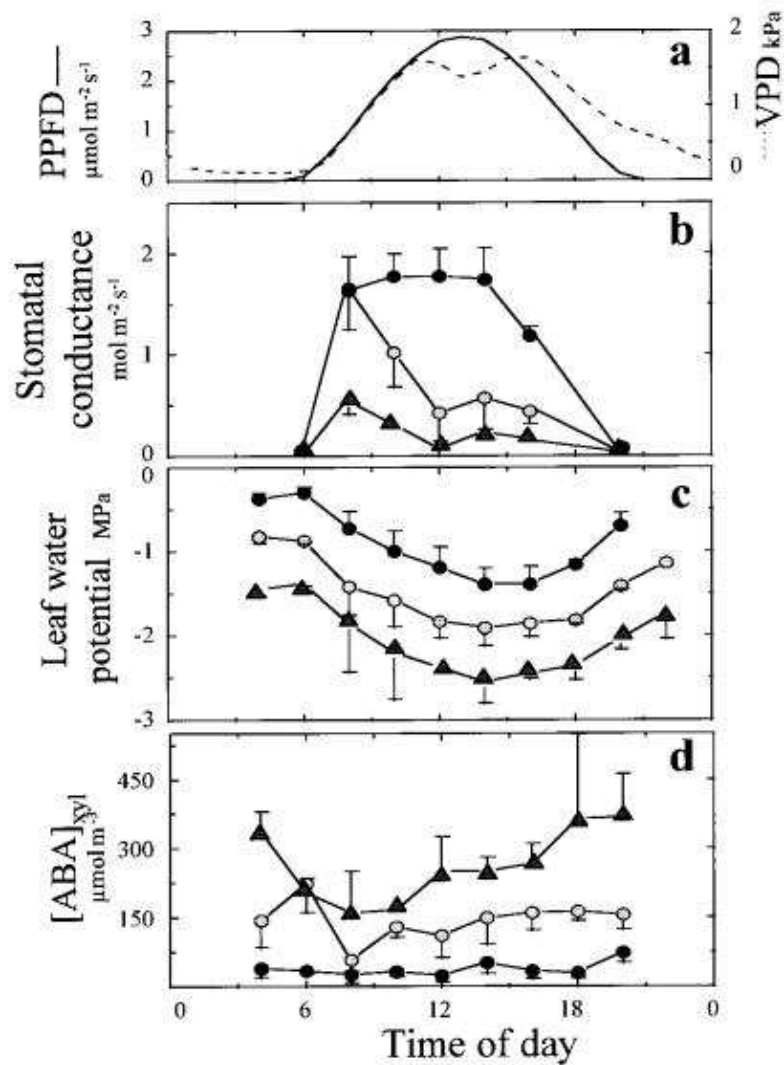


Figure 11 : Comportement typique d'un plante anisohydrigue (maïs, *Zea mays*). Le stress hydrique induit une chute du potentiel hydrique, une diminution de la conductance stomatique corrélée à une augmentation de la concentration en ABA la plante. Rond noir : témoin, rond blanc : stress modéré, triangle noir : stress sévère. Les points représentent des valeurs moyennes par traitement et les barres d'erreur les intervalles de confiance au niveau 0.95. (Tardieu and Simonneau, 1998).

L'évitement se traduit par la capacité à maintenir à des niveaux élevés le potentiel hydrique de leurs tissus. Cela implique des mécanismes permettant d'augmenter l'absorption en eau et/ou d'en réduire les pertes. A court terme, cela se traduit par un fort contrôle stomatique, c'est-à-dire une fermeture rapide des stomates afin de limiter les pertes en eau et de maintenir le potentiel hydrique à des valeurs élevées. Les plantes présentant ce comportement ont été qualifiées de plantes isohydriques (Figure 10) (Tardieu and Simonneau, 1998; Bréda et al., 2006). Lors d'épisodes de sécheresse, les plantes isohydriques présentent une faible conductance stomatique qui est corrélée à une forte accumulation d'ABA et un potentiel hydrique élevé (Figure 10). A titre d'exemple, *Populus euramericana* est une espèce à comportement isohydrique (Tardieu and Simonneau, 1998). A moyen terme, des mécanismes d'ajustements morphologiques peuvent conduire à une diminution de l'évaporation. La surface évaporative tend à être diminuée par la réduction du nombre de feuilles et de leur surface (Bréda et al., 2006; Shao et al., 2008; Xu and Zhou, 2008). Ainsi, des vignes ayant subi une sécheresse montrent une surface foliaire deux fois moins importantes que des plants témoins irrigués (Schultz, 2003). De plus, une réduction de la densité des stomates, l'enroulement des feuilles, ou l'enfouissement des stomates limitent la transpiration (Bréda et al., 2006; Touchette et al., 2007). La diminution de la conductance cuticulaire limite aussi l'évaporation à travers l'épiderme des feuilles.

A ces mécanismes de réductions de perte en eau, s'ajoutent aussi ceux augmentant l'absorption de l'eau. Cela se traduit par une augmentation de la profondeur, de la densité et de l'efficacité de l'enracinement (Shao et al., 2008). A titre d'exemple, si les chênes *Quercus ilex* et *Quercus suber* cohabitent dans des régions méditerranéennes, *Q. ilex* présente un enracinement plus profond qui lui confère une meilleure résistance à la sécheresse que *Q. suber* (David et al., 2007). Des mécanismes moléculaires comme l'induction d'aquaporines peuvent aussi améliorer le transfert d'eau dans les racines (Aroca et al., 2012).

L'ensemble de ces processus d'évitement conduisent à une diminution du rapport de biomasse entre les parties aériennes et les parties souterraines de la plante (Brendel and Cochard, 2011).

Enfin, d'autres mécanismes d'évitement sont basés sur l'utilisation des réservoirs d'eau dans les tissus. Ces stocks peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. Lorsque la transpiration augmente et que le potentiel hydrique diminue, l'eau stockée est transférée dans le continuum hydraulique afin de tamponner la demande hydrique et limiter la chute de potentiel hydrique (Figure 4) (Holbrook, 1995; Meinzer et al., 2001). Le rôle joué par ces réservoirs d'eau dépend de leur capacitance. Celle-ci est définie par la quantité d'eau qui peut être mobilisée pour une force donnée. En pratique, la capacitance est déterminée par la variation de teneur en eau par unité de variation de potentiel hydrique (Holbrook, 1995).

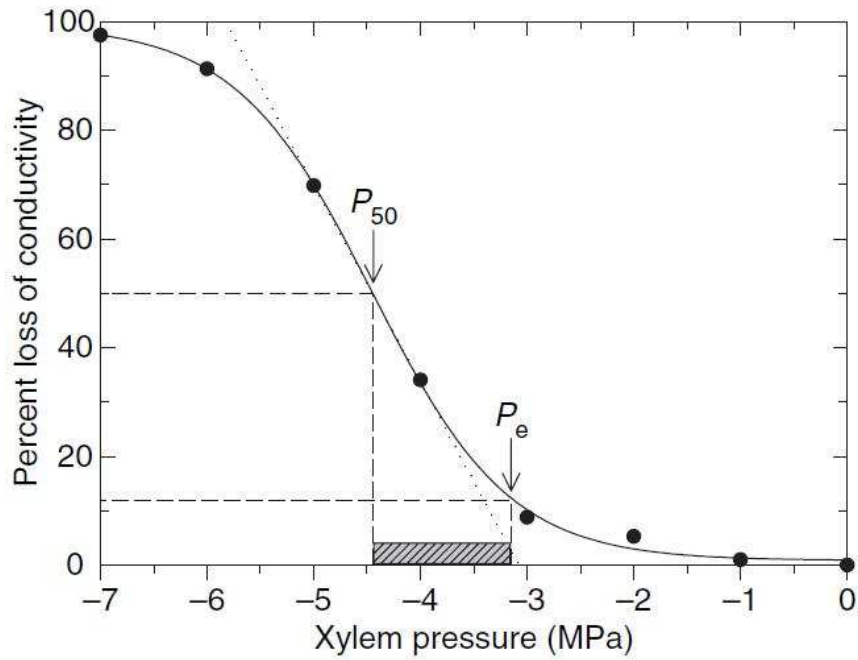


Figure 12 : Courbe de vulnérabilité à l'embolie typique montrant la relation entre le pourcentage de perte de conductance (PLC) et la pression du xylème. La pression du xylème correspondant à 50 % de perte de conductance (P_{50}) et la pression d'entrée d'air dans le xylème (P_e) sont représentés. La zone grise correspond à l'écart de pression entre le P_{50} et P_e (Meinzer et al., 2009). Cet écart est un des indices permettant d'évaluer la marge de sécurité hydraulique.

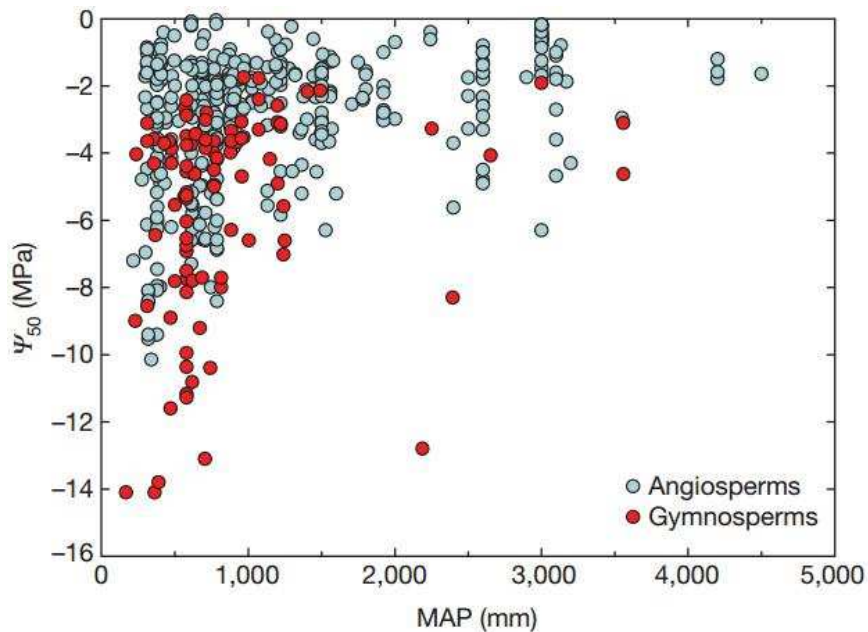


Figure 13 : Relation entre la résistance à l'embolie (P_{50}) d'espèces et les précipitations annuelles moyennes (MAP) de leurs habitats. Chaque point représente une espèce. Plus les conditions du milieu sont arides (MAP faible) plus le P_{50} tend à être négatif. Les espèces des conditions arides ayant un P_{50} élevé présentent une stratégie d'évitement. (Choat et al., 2012).

La tolérance à la sécheresse consiste à maintenir des niveaux de transpiration et de photosynthèse significatifs indépendamment des conditions hydriques environnantes. Ainsi, en situation de sécheresse, le contrôle stomatique est plus faible et les organes présentent une diminution du potentiel hydrique. Les plantes tolérantes expérimentent donc une chute des potentiels hydriques. Les plantes présentant ce comportement ont été qualifiées de plantes anisohydriques (figure 11). La tolérance à la déshydratation se base sur des processus d'ajustement osmotique des cellules et par les propriétés des éléments conducteurs de l'eau qui permettent une tension plus élevée sur la colonne d'eau (Brendel and Cochard, 2011). L'ajustement osmotique se fait par l'accumulation dans les cellules d'osmolytes tels que des sucres, des acides aminés (proline, glycine bêtaïne) et des polyols (D-pinitol, D-ononitol) (Bartels and Sunkar, 2005). Leur accumulation à haute concentration permet d'augmenter le potentiel osmotique des cellules et de limiter les pertes en eau. Ces mécanismes couplés à l'élaboration d'un xylème résistant à l'embolie permettent à la plante d'assurer des fonctions physiologiques en situation de sécheresse. Ainsi, une étude montre que des arbres isohydriques perdent leurs feuilles pendant les sécheresses alors que les arbres maintenant une surface foliaire présentent un comportement anisohydrique (Brodribb and Holbrook, 2003). Les arbres anisohydriques présentent l'avantage d'avoir un taux d'assimilation de carbone supérieur aux plantes isohydriques et une meilleure efficacité de l'eau en condition de sécheresse. En revanche, cette assimilation se fait au risque de perte de conductivité du xylème causée par l'embolie (McDowell, 2011). Un des facteurs physiologiques essentiels de tolérance est donc la capacité du xylème à supporter les forces tensions. La résistance du xylème à l'embolie est généralement évaluée par une courbe de vulnérabilité décrivant la relation entre les tensions du xylème et le pourcentage de perte de conductance (*PLC*). Ces courbes ont typiquement une forme sigmoïdale (Figure 12), avec les valeurs de *PLC* qui augmentent alors que la pression diminue. P_e représente la pression d'entrée d'air dans le xylème. Au delà de P_e , il y a une augmentation abrupte de la pente qui sera ensuite suivie d'une phase de perte de conductivité plus graduelle jusqu'à atteindre un maximum de 100% de *PLC*. Les espèces anisohydriques présenteraient un xylème plus résistant à l'embolie (Hoffmann et al., 2011; McDowell, 2011). De plus, il a été montré que la résistance à l'embolie varie entre les espèces et les biomes et peut expliquer en grande partie la distribution des espèces forestières (Maherali et al., 2004; Delzon et al., 2010; Choat et al., 2012) (Figure 13).

Lorsque les taux d'embolie sont élevés, l'arbre meurt (McDowell et al., 2008; Meinzer and McCulloh, 2013; Ogasa et al., 2013). A titre d'exemple, il a été montré récemment que des taux d'embolie proche de 88% chez *Populus tremula*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, *Quercus ilex* et *Quercus petraea* étaient létaux (Barigah et al., 2013; Urli et al., 2013). La pression correspondant à 50 % de *PLC* (P_{50}) est communément utilisée pour comparer des espèces. Le P_{50} présente une

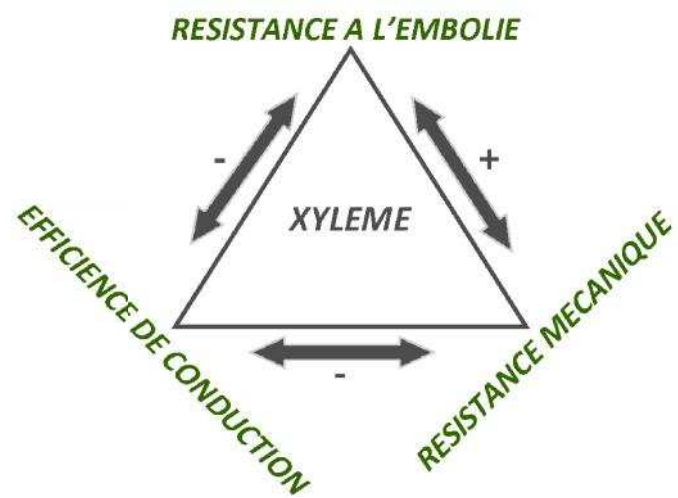


Figure 14 : Interactions entre les fonctions hydrauliques et mécaniques du xylème. Sa structure représente un compromis entre une efficacité de conduction, une résistance mécanique et à l'embolie. D'après Baas et al. (2004).

forte relation avec les contraintes écologiques des espèces (Choat et al., 2012) (Figure 13).

En pratique, la distinction entre stratégies isohydrique et anisohydrique est peu claire (Franks et al., 2007; Domec and Johnson, 2012). En effet, on ne peut classer toutes les situations en deux ensembles. D'une part, il faut savoir qu'au sein d'une même espèce, différents génotypes peuvent présenter des différences de stratégie face à la sécheresse (Hinckley et al., 1993; Schultz, 2003). D'autre part, il est probable que certains arbres aient le potentiel de passer d'un comportement isohydrique à anisohydrique de manière à optimiser l'assimilation de carbone en fonction du potentiel hydrique du sol (Domec and Johnson, 2012). Les phénomènes de résistance ne sont pas exclusifs et il convient donc de concevoir les comportements anisohydriques et isohydriques comme des extrêmes d'un gradient de comportement face au déficit hydrique du sol (Meinzer and McCulloh, 2013). Depuis quelques années, les hydrauliciens tendent à évaluer le contrôle stomatique et la résistance à l'embolie du xylème de manière intégrée et, plutôt que qualitative via les notions d'isohydrie et d'anisohydrie, de manière quantitative avec la notion de marge de sécurité (safety margin). Cette marge de sécurité représente l'écart de valeurs entre des pressions pour lesquels des phénomènes hydrauliques surviennent dans une plante. Ainsi, la marge de sécurité peut représenter la différence entre la pression induisant 90 % de fermeture des stomates et le P_{50} ou encore l'écart de pression entre P_e la pression d'entrée d'air dans le xylème et le P_{50} (Meinzer et al., 2009; Choat et al., 2012) (Figure 12). Lors d'un épisode de sécheresse modérée, il a été montré que la régulation stomatique limite les tensions du xylème à une valeur supérieure à P_e , évitant ainsi des taux d'embolie élevés (Brodribb and Holbrook, 2003; Domec et al., 2006; Meinzer et al., 2009). Le contrôle stomatique est intimement coordonné avec les changements dynamiques des propriétés hydrauliques du transport de l'eau en amont (Cochard et al., 1996; Mencuccini, 2003). Ainsi, les espèces isohydriques comme anisohydriques tendent à limiter l'embolie via la régulation stomatique. L'embolie débute généralement après que la conductance stomatique soit tombée à des valeurs inférieures à 10% de leur valeur maximale (Bréda et al., 2006). Les espèces anisohydriques peuvent être caractérisées par un P_{50} plus négatif et une pente de courbe de vulnérabilité plus faible que les espèces isohydriques (Meinzer and McCulloh, 2013).

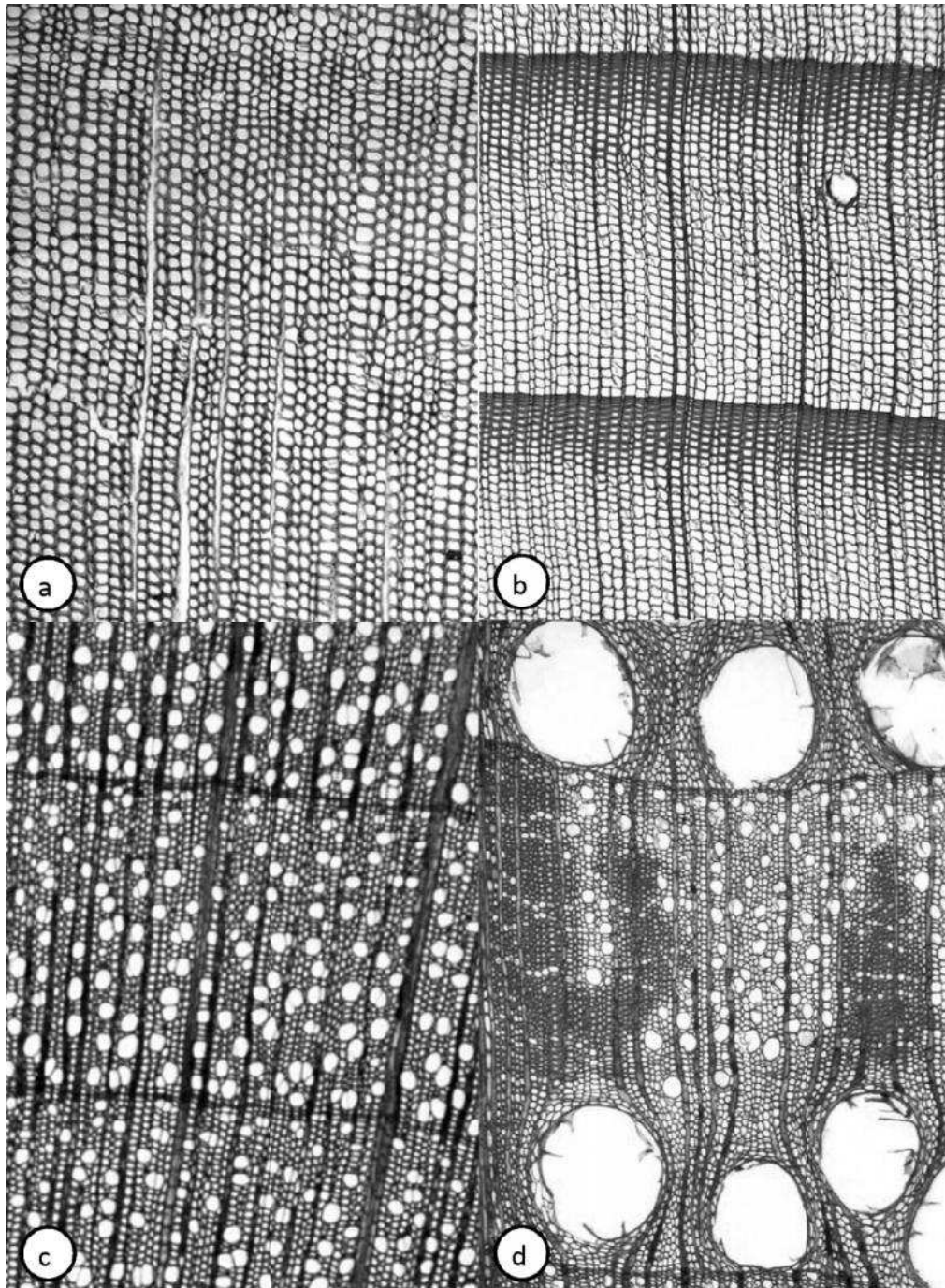


Figure 15 : Coupes transversales de bois observées en microscopie optique. *Austrotaxus spicata* (a) et *Picea mariana* (b) sont des espèces gymnospermes et présentent un bois homoxylé. *Rhododendro wadanum* (c, à pores diffus) et *Quercus alba* (d, à zone poreuse) sont des espèces angiospermes et présentent un bois hétéroxylé. Si la différence entre bois d'été et bois de printemps est détectable chez *Picea mariana* et *Quercus alba*, les espèces *Austrotaxus spicata* et *Rhododendro wadanum* ne présentent pas de structure différente de bois entre printemps et été. (D'après InsideWoodDatabase)

III STRUCTURE ET FORMATION DU XYLEME ET DES PONCTUATIONS

Le xylème est un tissu spécialisé dans la conduction de la sève brute (Figure 14). Chez les espèces annuelles et organes jeunes des ligneux, la fonction de conduction est assurée par le xylème primaire. Ce dernier est formé à partir du procambium et il a un sens de différenciation longitudinal. Une fois que l'organe a atteint sa longueur maximum et que les processus d'élongation cessent, le bois ou xylème secondaire est mis en place. Il est prépondérant chez les arbres et arbustes et présente un sens de différenciation centrifuge. Le xylème secondaire participe à la croissance en diamètre des organes et assure d'autres fonctions physiologiques que la conduction de la sève tels que le soutien mécanique et le stockage d'eau et de molécules carbonées (Tyree and Zimmermann, 2002; Baas et al., 2004; Pratt et al., 2007). Il est probable qu'il existe des interactions entre ces fonctions assurées par un même tissu. Ainsi, les fonctions hydrauliques et mécaniques sont appréhendées dans la littérature sous forme de compromis (Figure 14) (Baas et al., 2004). L'efficacité de transport de l'eau serait en compromis avec la résistance mécanique et la résistance à l'embolie. Cependant ces compromis ne s'appliquent pas à tous les cas de figure. Le bois des angiospermes est hétéroxylé avec des types cellulaires adaptés à chacune de ces fonctions, alors que celui des gymnospermes est homoxylé avec un même type cellulaire assurant les fonctions de conduction et de soutien. Les aspects de structures et fonctions du bois des gymnospermes seront succinctement abordés dans ce chapitre et surtout comparé au bois des angiospermes. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur les fonctions hydrauliques du xylème secondaire et les aspects de compromis avec les propriétés mécaniques seront évoqués sous forme de synthèse dans un sous chapitre dédié.

1) Structure du xylème et xylogenèse

a. Structure du xylème et variabilité interspécifique

Le xylème secondaire est un tissu majoritairement constitué de cellules mortes. Le bois des gymnospermes est homoxylé. Il a un aspect homogène car il est majoritairement constitué d'un seul type cellulaire (environ 90%), les trachéides, qui assurent simultanément les fonctions de conduction et de support mécanique (Figure 15a, b) (Baas et al., 2004). Les cellules du parenchyme xylémien sont ainsi en faible proportion dans le tissu et même inexistantes chez certaines espèces (ex : les épicéas et pins). Le bois homoxylé s'oppose au bois hétéroxylé des angiospermes qui présente un aspect hétérogène (Figure 15c, d) (Baas et al., 2004). Le bois des angiospermes est composé de différents types cellulaires : les vaisseaux, les trachéides, les fibres et les cellules du parenchyme. Les vaisseaux sont spécialisés dans la conduction, les fibres sont spécialisées dans le support mécanique et les trachéides assurent les deux fonctions. Les cellules du parenchyme assurent des fonctions de

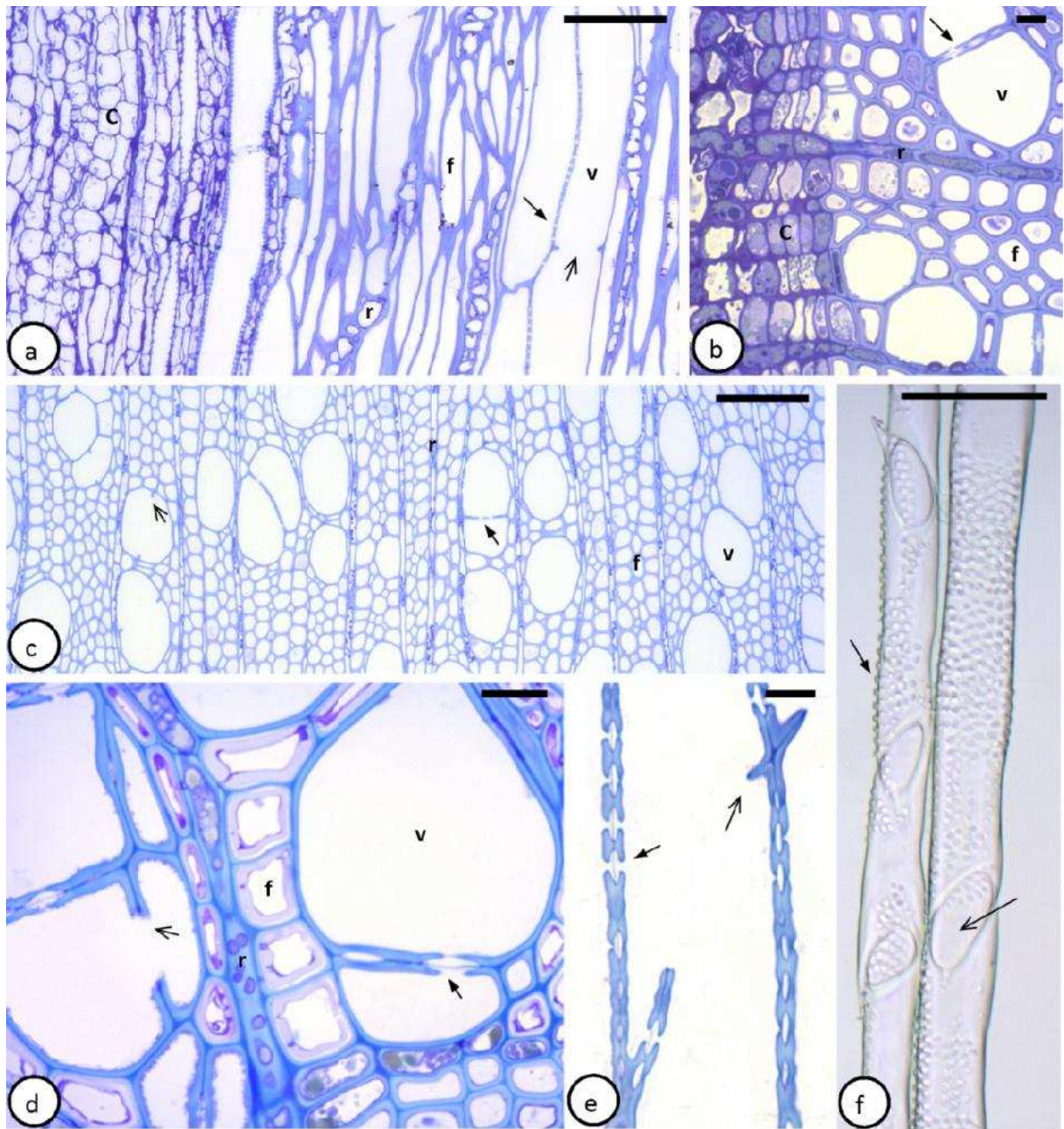


Figure 16 : Bois de *Populus tremula x alba* observé en microscopie optique et coloré au bleu de toluidine. Coupes longitudinale (a) et transversale (b) du bois au niveau de la zone cambiale (c, à gauche de l'image). (c) Coupe transversale de xylème secondaire montrant l'organisation générale du tissu. Les divisions anticlinales du cambium confèrent une organisation radiale au xylème secondaire. Les initiales du cambium se différencient afin de former des vaisseaux (v), des fibres (f) et des cellules parenchymateuses formant les rayons ligneux (r). Coupes transversale (d) et longitudinale (e) du xylème. Les vaisseaux sont reconnaissables par leur diamètre et par les perforations (flèches ouvertes) qui relient les éléments de vaisseaux. Les ponctuations (flèches pleines) connectent les vaisseaux. (f) micro-moulage au silicone de deux vaisseaux. Echelles a, c, f: 100 μm , Echelles b, d, e: 10 μm .

transport radial, de stockage, et interviendraient dans le contrôle du transport axial de la sève. Le bois est un tissu secondaire, c'est-à-dire qu'il est mis en place à partir d'un méristème secondaire : le cambium ou assise libéro-ligneuse (Figure 16 a, b). Le sens de différenciation du bois est centrifuge. Ainsi, la partie la plus interne du bois est plus ancienne et le bois le plus récent est mis en place à la périphérie. Chaque année, dans les régions tempérées, l'activité cambiale est stoppée durant la phase hivernale. En conséquence, le bois est formé d'une succession de cernes correspondant chacune à une année de croissance (Figure 15a, c, d). L'étude des cernes est la dendrochronologie et cette discipline renseigne des conditions environnementales du passé. Pour certaines espèces tropicales (ex : *Austrotaxus spicata*), il n'y a pas de saisons d'arrêt de croissance et le bois ne présente donc pas d'organisation en cernes (Figure 15b). Les limites des cernes se distinguent par la transition entre le bois d'été de l'année n et le bois de printemps de l'année n+1.

Au printemps, l'activité cambiale est reprise et met en place un bois aux propriétés spécifiques. Les cellules mises en place assurent une conduction importante pour la reprise de croissance. Cela se traduit par des cellules conductrices avec des diamètres importants (Figure 15a et d). ; le bois formé est aussi plus poreux et clair. A l'été, les flux de sève sont réduits et les éléments conducteurs mis en place ont un diamètre plus petit et la surface de conduction est plus réduite. Chez les gymnospermes, cela se traduit par des trachéides à paroi épaissies (figure 15a). Chez les angiospermes, le bois d'été comporte de nombreuses fibres et des diamètres de vaisseaux plus faibles (Figure 15d) ; et le bois d'été est moins poreux et plus sombre que le bois de printemps.

Chez les espèces à bois hétéroxylés, le bois à pores diffus (Figure 15c) s'oppose au bois à zone poreuse (Figure 15d). Les bois à zone poreuse présentent des différences marquées de bois de printemps et de bois d'été (Figure 15d). En revanche, les bois à pores diffus (ex *Populus tremula x alba*) possèdent des vaisseaux ayant des tailles sensiblement identiques et une répartition homogène tout au long de l'année. Il est donc plus difficile de distinguer le bois de printemps du bois d'été dans les espèces à pore diffus (Figure 15c). Beaucoup d'espèces présentent des caractères intermédiaires de ces deux extrêmes et ont des bois à zone semi-poreuse (ex : *Fagus sylvatica*).

A la différence des cellules conductrices et des fibres, les cellules du parenchyme xylémien sont vivantes (Figure 16b et d). Une grande partie de ces cellules sont organisées en rayon ligneux (Figure 16a-c). Les rayons ligneux ont une à 30 cellules d'épaisseur dans la direction tangentielle et permettent d'assurer le transport de l'eau et des solutés contenus dans les cellules conductrices en direction des tissus périphérique de la tige. Les cellules du parenchyme xylémien participent au processus de lignification de la paroi secondaire des vaisseaux et fibres voisines (Schuetz et al., 2012). Elles assurent aussi des fonctions de stockage d'eau et de carbone (présence d'amidon) et participent au contrôle du transport de l'eau, notamment lors des phénomènes de reprise de croissance ou encore pour tamponner la demande évaporative via les processus de capacitance

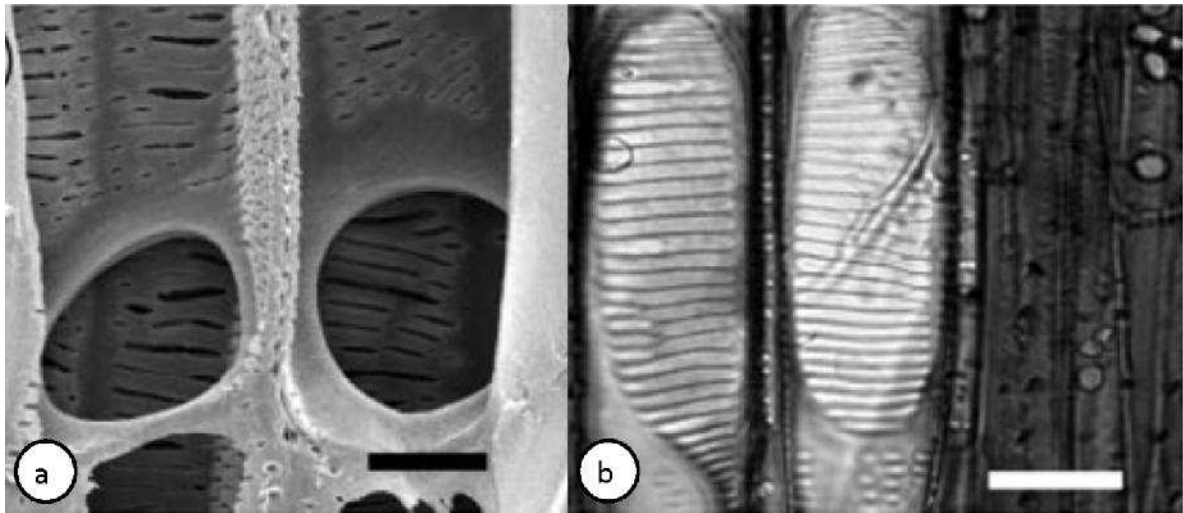


Figure 17 : Perforation simples chez *Parathesis chiapensis* (a) et perforations scalariformes chez *Abelia spathulata* (b) observées en MEB. Echelle : 20µm. (Jansen et al., 2004a)

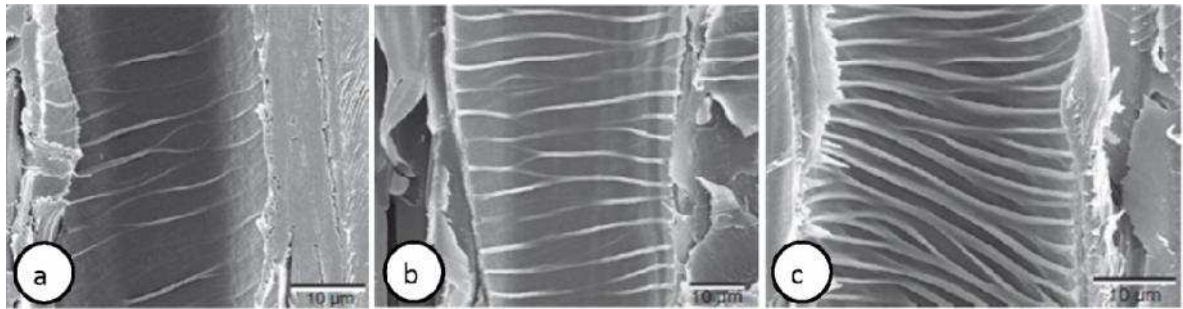


Figure 18 : Ornémentations tapissant la paroi interne de vaisseaux chez *Acer saccharinum* (a), *Acer glabrum* (b) et *Acer grandidentatum* (c) observées en MEB. Echelles : 10µm. (Lens et al., 2011)

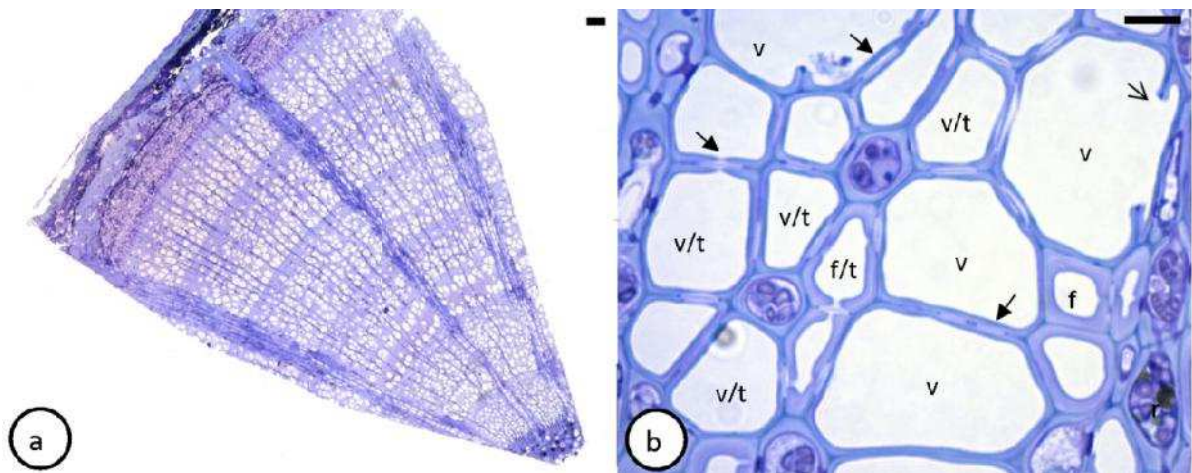


Figure 19 : Coupe transversale de bois de *Fagus sylvatica* observée en microscopie optique et coloré au bleu de toluidine. Le hêtre a un bois à zone semi poreuse, (a). Les trachéides (t) sont facilement confondus avec les vaisseaux (v) ou les fibres (f), (b). Des ponctuations sont indiquées d'une flèche pleine et les perforations d'une flèche ouverte. r : cellule de rayon ligneux. Echelle (a) : 100 µm, (b) : 20 µm.

(Holbrook, 1995; Carlquist, 2007a). Sur coupe transversale, les cellules du parenchyme xylémien se reconnaissent car ce sont les seules cellules vivantes du tissu (Figure 16b et d). De plus, lorsque ces cellules sont organisées en rayon, on les reconnaît par leur allongement axial qui s'oppose à l'allongement longitudinal des cellules conductrices et fibres (figure 16a-d). Les cellules du parenchyme xylémien à allongement longitudinal se reconnaissent à leur paroi peu épaisse et non lignifiée. Les fibres sont des cellules mortes de 1 mm de long en moyenne, reconnaissable à leurs parois épaissies (Figure 16c et d)(Wheeler et al., 2007).

Les vaisseaux ont des diamètres relativement importants par rapport aux autres cellules et des perforations (Figure 16a-d). La perforation est une caractéristique fondamentale du vaisseau (Figure 16a, c-f). Un vaisseau est constitué de plusieurs éléments de vaisseaux qui s'alignent (Figure 16f) pour atteindre plusieurs centimètres à quelques mètres de long (Sperry, 2003). Les parois de leurs extrémités sont dégradées et forment des ouvertures, les perforations, qui assurent une continuité hydraulique entre les éléments du vaisseaux.

Il y a différents types de perforations. Les perforations simples, correspondent à de larges ouvertures reliant un élément de vaisseau à un autre (Figure 17a). Il existe aussi des perforations scalariformes, c'est-à-dire en forme d'échelle, présentant des barres transversales au niveau de l'ouverture (Figure 17b). Les perforations scalariformes seraient des structures plus primitives que les perforations simples car elles représentent une résistance au flux de sève (Schulte, 1999). La nature primitive de ces structures est soutenue par la phylogénie des angiospermes. En revanche, les perforations scalariformes semblent présenter un avantage adaptatif dans certains environnements tempérés froids (Zimmermann, 1983; Jansen et al., 2004a). Ces structures limiteraient la propagation de l'embolie induit par les cycles de gel/dégel (Tyree and Zimmermann, 2002). Toutefois, cet avantage adaptatif n'explique pas la présence de ces structures dans des biomes tels que les forêts tropicales et les déserts (Jansen et al., 2009). Il est possible d'observer les deux types de perforations au sein de la même espèce, du même individu (Carlquist, 2001; Oskolski et al., 2009). A titre d'exemple, *Fagus sylvatica* présente les deux types de perforations. Les perforations scalariformes sont rares dans cette espèce et ont tendance à être préférentiellement présentes dans le bois d'été au niveau de vaisseaux de faible diamètre.

Les vaisseaux de certaines espèces peuvent présenter des ornements, ou épaississement hélicoïdaux, sur la paroi interne des vaisseaux (Figure 18) (Carlquist, 1966; Lens et al., 2011). Ces structures sont généralement observées chez les espèces adaptées aux environnements secs (Carlquist, 1966; Lens et al., 2011). Ces épaississements hélicoïdaux renforceraient les parois des vaisseaux des espèces de milieux arides qui expérimentent des tensions très fortes. Il a été proposé que ces ornements diminuent l'angle de contact entre l'eau et les parois des vaisseaux, ce qui

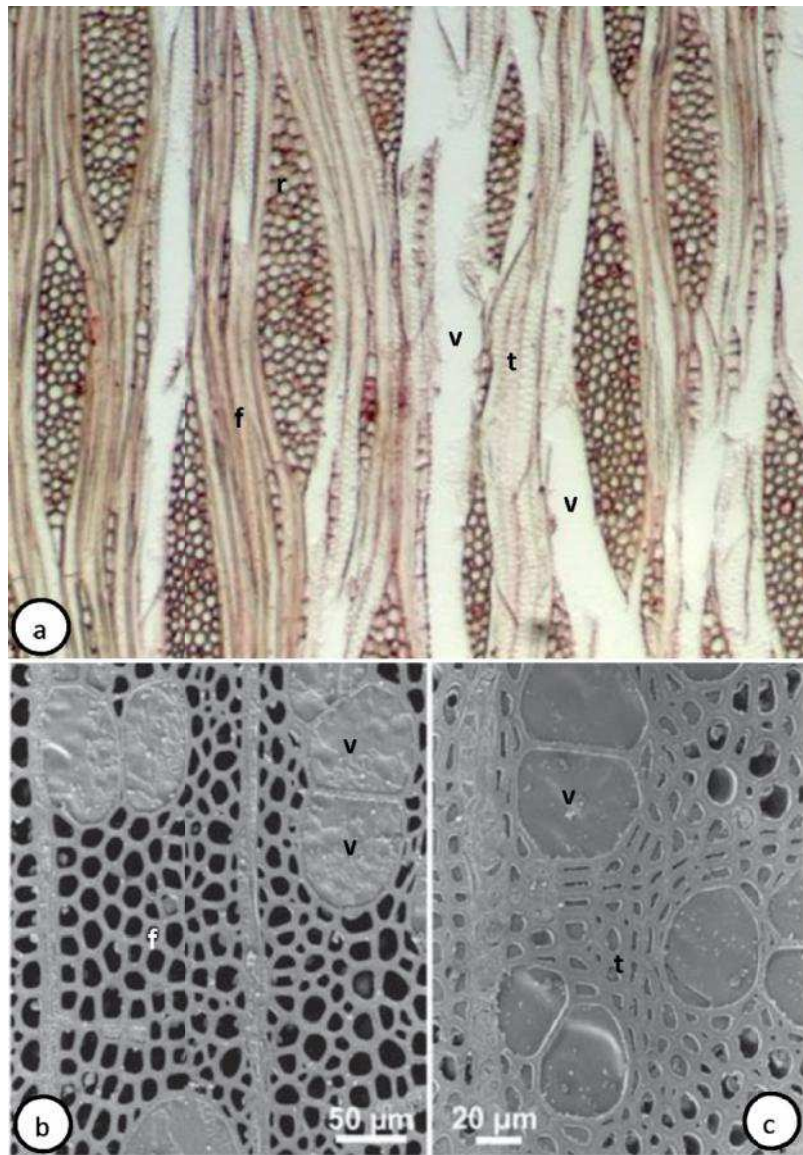


Figure 20 : Observation de trachéides dans le bois d'angiospermes. Coupe longitudinale de bois de *Hedera helix* observée en microscopie optique et colorée à la safranine (a). Les trachéides (t) ne sont constituées que d'une cellule et ne présentent pas de perforation à la différence des vaisseaux (v). Elles présentent un plus grand nombre de ponctuations sur leur axe longitudinal que les fibres (f). Les fibres apparaissent plus sombres en raison de leurs parois plus épaisses. Coupe transversale de bois observé en cryo-MEB (b-c). La différence entre les fibres et les trachéides est fonctionnelle. Les trachéides sont conductrices et sont donc remplies d'eau. Leurs lumières apparaissent donc grises comme les vaisseaux en cryoMEB. Les fibres ne sont pas conductrices, leurs lumières sont remplies d'air, et apparaît noire. (b) *Betula japonica* présente un bois sans trachéide. (c) *Prunus sargentii* présente un bois porteur de trachéides. D'après (Sano et al., 2011) et InsideWoodDatabase.

augmenterait les propriétés de mouillabilité des parois, réduisant le risque de cavitation et de propagation de l'embolie (Kohonen and Helland, 2009).

Une trachéide est une cellule conductrice. A la différence des vaisseaux, elle n'est constituée que d'une seule cellule et présentera généralement un plus faible diamètre (Sano et al., 2011). Si une fibre est remplie d'air et ne présente qu'une fonction de soutien, une trachéide est remplie d'eau et assure les fonctions de conduction et de soutien (Sano et al., 2011). Les trachéides ne se retrouvent pas chez toutes les espèces. Ainsi, l'espèce *Populus tremula x alba* (Figure 16) n'en possède pas alors qu'elles sont présentes dans le bois de *Fagus sylvatica* (Figure 19). Les trachéides sont plus fréquemment présentes dans certaines familles comme les *Elaeagnaceae*, *Krameriaceae*, *Rosaceae* et les *Zygophyllaceae*. Les trachéides sont proposées comme présentant un avantage dans les milieux secs car elles augmenteraient la résistance à l'embolie des espèces (Carlquist, 2007b). Il est très délicat d'identifier une trachéide sur coupe transversale. En effet, si la nature d'un vaisseau est confirmée par une perforation, il est délicat de discriminer un vaisseau de faible diamètre d'une trachéide de grand diamètre en l'absence de perforation dans le plan. De même, si la caractéristique d'une fibre réside dans sa paroi épaissie, on retrouve généralement un gradient morphologique d'épaisseur de paroi entre une trachéide et une fibre. C'est pourquoi, l'identification des trachéides se fait classiquement sur coupe tangentielle ou par macération des cellules (Figure 20a). Sano et al., (2011) montrent la nature conductrice des trachéides avec des observations de cryo-SEM et prouvent ainsi que l'on peut identifier la nature d'une cellule conductrice par la morphologie de ses ponctuations (Figure 20b). Les ponctuations permettent la communication entre cellules à travers les parois et connectent notamment les vaisseaux entre eux (Figure 16 et Figure 19).

Le bois présente donc une grande diversité de structure avec des variations temporelles et interspécifiques. On retrouve une diversité de taille des types cellulaires mais aussi de leur organisation. Il y a notamment une grande diversité de types de regroupements de vaisseaux, de connectivité de cellule à cellule (perforation, ponctuation) et de propriétés de paroi (Wheeler et al., 2007). De plus, les vaisseaux présentent une grande variabilité de dimensions. A titre d'exemple, les Rhododendron ont des vaisseaux de diamètre faible (6 μm (Mayr et al., 2010)) alors que ceux des chênes peuvent atteindre plus de 100 μm (Mcelrone et al., 2004). Ces exemples illustrent des extrêmes de diamètre de vaisseau alors que la moyenne est autour de 20-30 μm (Wheeler et al., 2007). *Populus tremula* présente des vaisseaux faisant en moyenne 30 μm de diamètre (Tognetti et al., 1999) et ceux de *Fagus sylvatica* font en moyenne 20 μm (Cochard et al., 2005). Cette grande variabilité de structure traduirait des adaptations fonctionnelles aux conditions environnementales (Baas and Schweingruber, 1987; Wheeler et al., 2007). La structure et le fonctionnement des vaisseaux ont nécessité une attention particulière en raison de leur importance fonctionnelle pour le transport de l'eau (Baas and Schweingruber, 1987; Wheeler et al., 2007).

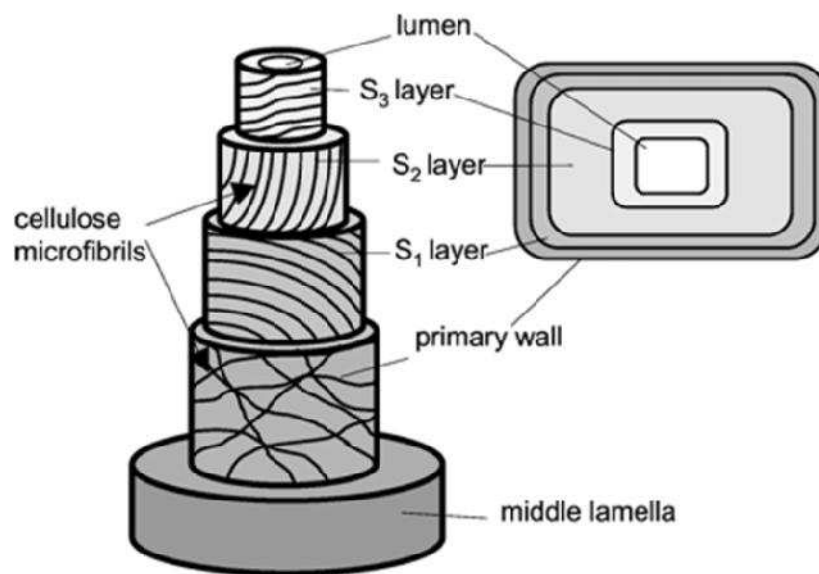


Figure 21 : Organisation schématique de la structure de la paroi d'un élément de vaisseaux. Chaque couche de la paroi cellulaire présente un arrangement des microfibrilles de cellulose qui lui est propre. La paroi secondaire est déposée en 3 couches successives, chacune ayant des micro-fibrilles organisées avec des angles différents. La lamelle moyenne assure l'adhésion des cellules entre elles. D'après Plomion et al. (2001).

b. Xylogénèse et mise en place des cellules conductrices

Le cambium forme le phloème secondaire à la périphérie et le bois en zone interne par des divisions anticlinales. Il est reconnaissable sur coupe par ses cellules non différenciées à paroi peu épaisses (Figure 16a et b). Les divisions anticlinales du cambium sont à l'origine de l'organisation radiale du xylème secondaire (Figure 16c). Les cellules cambiales se différencient en types cellulaires chez les angiospermes. Elles se différencient en cellules conductrices : les vaisseaux et les trachéides, en cellules de soutien : les fibres, ou encore en cellules du parenchyme xylémien.

La formation des vaisseaux à partir du cambium est réalisée en une succession de 4 étapes majeures : La division cellulaire, l'expansion cellulaire, l'épaississement pariétal via l'apposition d'une paroi secondaire, et enfin la mort programmée des éléments de vaisseaux (Plomion et al., 2001).

Le contrôle génétique de ces étapes a fait l'objet de nombreuses recherches ; elles sont toujours poursuivies. Après la division cellulaire, le devenir des cellules du xylème est contrôlé par des gènes de régulation. Les facteurs de transcription VND6 et VND7 dirigent la différenciation des vaisseaux, alors que la différenciation des fibres est contrôlée par le gène SND1. Ces facteurs de transcription appartiennent à la famille NAC (NAM/ATAF/CUC) (Oda and Fukuda, 2012). Les protéines de cette famille présentent un site de fixation à l'ADN très conservé en N-terminal et sont souvent impliquées dans des processus développementaux.

Les cellules programmées pour former des vaisseaux subissent une expansion longitudinale et radiale afin d'atteindre leur taille finale. Ce processus d'expansion cellulaire est réalisé durant la formation de la paroi primaire de la cellule. La paroi primaire est fine (environ 0.1 μm) et élastique (Plomion et al., 2001). Elle est principalement constituée de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines (Farrokhi et al., 2006). Les micro fibrilles de cellulose synthétisées font environ 3 nm de diamètre et sont disposées de manière aléatoire. La synthèse de la cellulose requiert l'activité d'un complexe de 36 sous-unités de protéines cellulose-synthase disposées en rosette (Farrokhi et al., 2006). Cette synthèse se réalise à partir de la membrane plasmique et les microtubules contrôlent le mouvement latéral du complexe le long de la membrane plasmique (Oda and Fukuda, 2012; Schuetz et al., 2012). Les micro-fibrilles de cellulose sont ensuite reliées entre elles par les hémicelluloses formant un réseau inclu dans une matrice de pectines (Plomion et al., 2001). Les pectines constituent en moyenne 30 % de la paroi primaire et sont une classe de molécules riches en acide galacturonique. L'auxine joue un rôle primordiale de régulateur de l'expansion cellulaire et les brassinostéroïdes seraient aussi impliqués dans ce processus (Turner et al., 2007). Les enzymes clés de l'expansion de la paroi sont les xyloglucanes endotransglycosylases, les endoglucanases, les expansines, les pectines méthylesterases et les pectinases (Plomion et al., 2001; Farrokhi et al., 2006).

Une fois l'expansion cellulaire accomplie, l'apposition de la paroi secondaire du vaisseau commence. Cette paroi présente une résistance mécanique plus importante et est divisée en trois

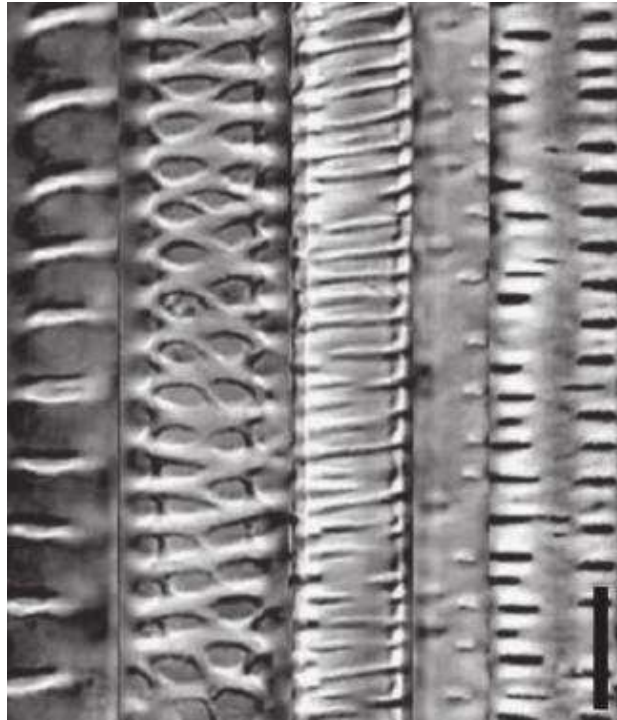


Figure 22 : Vaisseaux de hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* présentant différents motifs de paroi secondaire. De gauche à droite : spiralé, réticulé, scalariforme, ponctué (ponctuations circulaire et ponctuation allongées). Echelle : 10 μm . (Oda and Fukuda, 2012)

couches successives : S1, S2, S3 (Plomion et al., 2001). Pour chacune de ces couches, les microfibrilles de cellulose sont alignées et parallèles entre elles selon un angle propre (Figure 21). La couche la plus importante en termes d'épaisseur est la couche S2 qui correspond à 75-85% de l'épaisseur totale de la paroi soit 1 à 10 μm (Plomion et al., 2001). En termes de composition, la paroi secondaire est enrichie en lignines qui lui confèrent des propriétés de rigidité mécanique et d'hydrophobicité. Bien que les rapports de composition de la paroi secondaire varient entre les espèces, on peut estimer que la paroi secondaire est constituée principalement de cellulose (40-50%), d'hémicellulose (20-30 %) et de lignines (25-30%) avec une faible quantité de pectines et de protéines (Mellerowicz and Sundberg, 2008; Schuetz et al., 2012). Les microfibrilles ont un diamètre de 5-10 nm, plus important que celles de la paroi primaire (Farrokhi et al., 2006).

L'apposition de la paroi secondaire est régulée spatialement au sein d'un élément conducteur de manière conservée et très contrôlée. Lors de la formation de la paroi secondaire, les microfibrilles de cellulose sont déposées en premier et définissent le motif d'épaississement pariétal présent sur le vaisseau (Figure 22). Il y a une grande variabilité développementale et interspécifique des motifs d'épaississement pariétaux. En effet, dans les phases précoces de développement des organes, le protoxylème mis en place à partir du procambium présente des épaisissements de parois non réguliers : annulaires ou encore spiralées (Oda and Fukuda, 2012). Ces épaisissements assurent un degré de rigidification de la paroi tout en permettant l'élongation cellulaire des éléments formés (Schuetz et al., 2012). En effet, les parties de la paroi primaire exemptes de lignification demeurent extensibles. Les vaisseaux du métaxylème présentent une structure intermédiaire à similaire avec les vaisseaux du xylème secondaire. Ainsi, on retrouve des vaisseaux avec des épaisissements réticulés puis ponctués (Figure 22). Ces épaisissements de paroi ne permettent en revanche pas l'élongation des cellules.

La dernière étape de formation du vaisseau consiste en la mort programmée des éléments de vaisseaux. Des enzymes autolytiques telles que des nucléases et protéase (notamment la cystéine protéase) s'accumulent dans la vacuole (Groover et al., 1997; Schuetz et al., 2012). La dislocation du tonoplaste libère ces enzymes. Cette étape ne dure que quelques minutes. Vidé de son contenu cellulaire, le vaisseau devient alors un élément hydrauliquement conducteur.

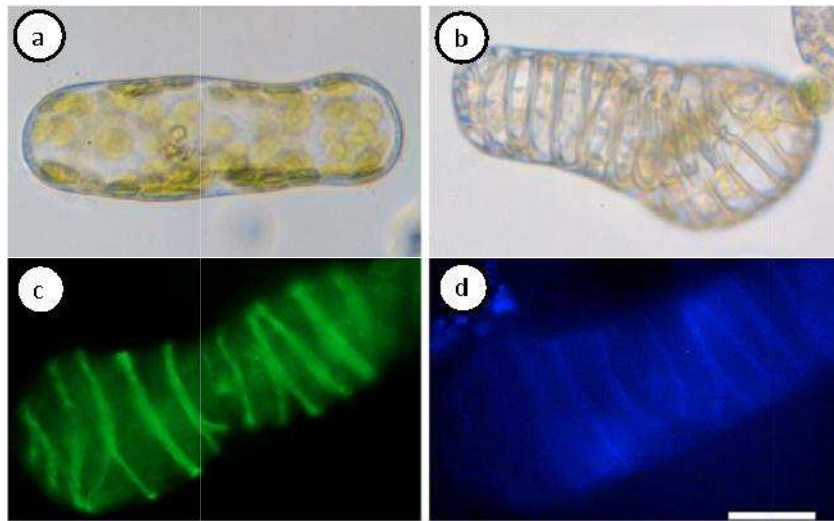


Figure 23 : Contrôle du dépôt de la paroi secondaire par les microtubules sur une cellule de *Zinnia elegans*. Cellule de mésophylle avant ajout des hormones induisant la différenciation en élément conducteur (a). Cellule 72 h après induction présentant des épaissements de paroi (b). Faisceaux de microtubules marqués par immuno-fluorescence (c). Même cellule que (c) montrant les microfibrilles de cellulose de la paroi secondaire marquée au Calcofluor (d). D'après Mao et al. (2006). Echelle : 10µm.

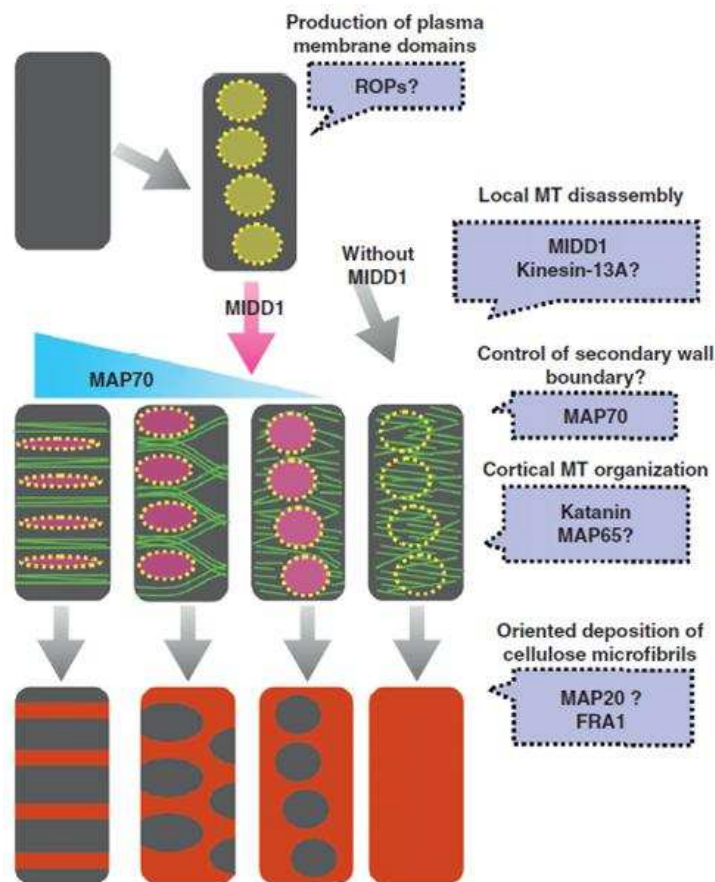


Figure 24 : Modèle du contrôle spatial pour le dépôt de la paroi secondaire. Des domaines de la membrane plasmique sont produits par des RAP. Ensuite MIDD1 est recruté pour induire le désassemblage local des microtubules. MAP70 organise les microtubules afin de définir la morphologie de la ponctuation. Après cela, les katanines et MAP65 organisent

les microtubules dans les zones d'épaississements de paroi. Enfin FRA1 et MAP contrôlent l'orientation du dépôt de cellulose sur la paroi. (Oda and Fukuda, 2012).

2) *Structure et synthèse des ponctuations*

a. Contrôle génétique de l'organisation des ponctuations

Les ponctuations sont les espaces de paroi primaire exempte de paroi secondaire. Elles peuvent présenter une morphologie variable, de circulaire à allongée (figure 22) en fonction des espèces ou des stades de développement. A partir des années 80, l'étude de l'organisation de la paroi secondaire des cellules conductrices est facilitée par la culture de cellules du mésophylle de *Zinnia elegans* (Figure 23) (Fukuda and Komamine, 1980; Fukuda and Kobayashi, 1989). Ces cellules se différencient en élément conducteur sous l'action combinée de deux hormones : l'auxine et la cytokinine (Fukuda and Kobayashi, 1989). A cette même époque, les auteurs mettent en évidence le contrôle de l'apposition de la paroi secondaire par le cytosquelette qui co-localise avec cette même paroi (Fukuda and Kobayashi, 1989; Mao et al., 2006).

Ce modèle *Zinnia*, et plus tard l'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana*, ont permis de mieux comprendre le contrôle spatial de la localisation et de la morphologie des ponctuations. Oda et Fukuda (2012) proposent un modèle du contrôle moléculaire par les MAP (microtubule associated proteins) (Figure 24). Le schéma spatial d'apposition de paroi secondaire est défini par des ROPs (Rac/Rho GTPase). Ces protéines sont disposées sur la membrane plasmique pour définir les zones exemptes de paroi secondaire. Ces ROP recrutent des protéines associées aux microtubules : MIDD1. Les protéines MIDD1 empêchent l'assemblage des microtubules sur ces sites et définissent ainsi la localisation d'une ponctuation. La protéine MIDD1 interagirait avec une kinesine pour dépolymériser les microtubules localement. La protéine MAP70 contrôle ensuite la morphologie plus ou moins circulaire de la ponctuation. Enfin, l'organisation et le regroupement des microtubules sont contrôlés par une MAP65. Le contrôle du dépôt de la cellulose sur la paroi suivant les microtubules est assuré par les protéines MAP20 et FRA1. La protéine FRA1 contrôlerait l'orientation des dépôts de microfibrilles en régulant le complexe enzymatique de cellulose-synthase ou en contrôlant le transport des vésicules. La protéine MAP20 se fixe aux microtubules et favoriserait l'activation du complexe de synthèse de cellulose.

b. Structure des ponctuations entre cellules conductrices

En général la ponctuation d'une cellule est localisée exactement en regard d'une ponctuation de la cellule adjacente. La structure résultant est classiquement nommée paire de ponctuations, mais on considère généralement que le terme ponctuation englobe la totalité de la structure. Les ponctuations raccordent les cellules et présentent des différences structurelles et probablement

biochimiques en fonction des types cellulaires qu'elles connectent (Figure 25). Les ponctuations connectant des cellules conductrices sont bordées. En revanche, les ponctuations connectant des

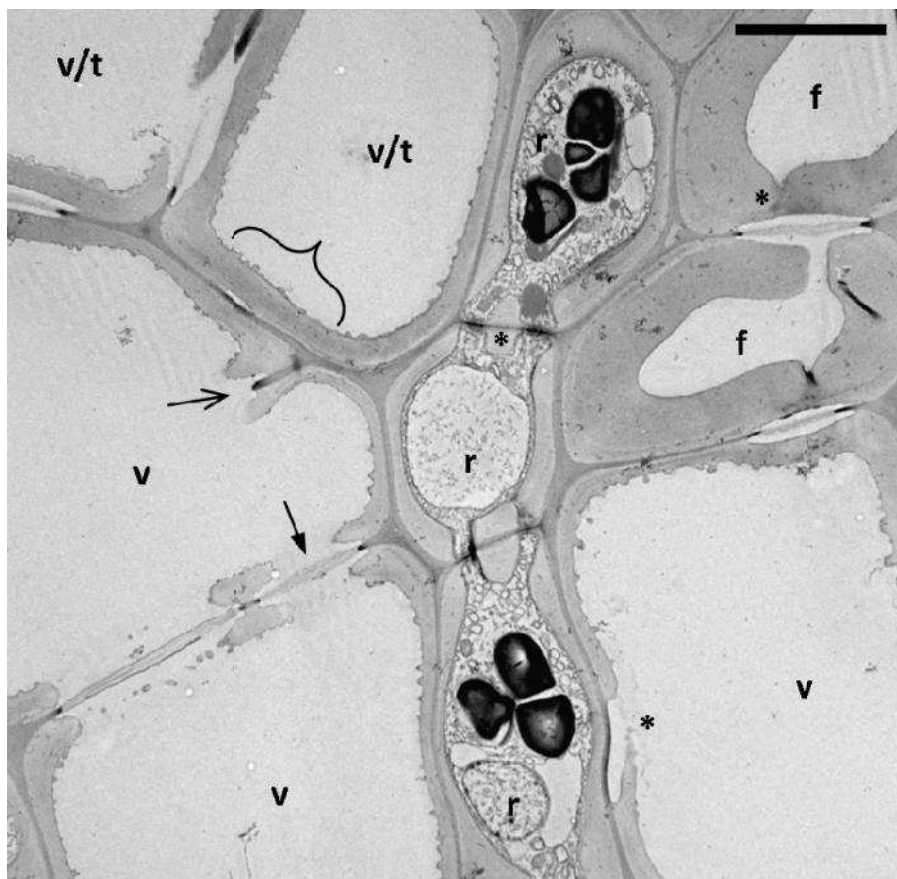


Figure 25 : Coupe transversale de bois de *Fagus sylvatica* observée en MET. La coupe présente une épaisseur de 60 à 90 nm d'épaisseur. Echelle : 5 µm. v= vaisseau ; r = cellule de rayon ligneux ; f= fibre ; t=trachéide. Fleche pleine : ponctuation entre deux vaisseaux, flèche ouverte : perforation. * : ponctuation entre fibre, entre deux cellules du parenchyme xylémien, entre cellule de rayon et cellules conductrices. L'accolade montre des ornements sur les parois d'un vaisseau.

fibres ne sont pas bordées, présentent des plus petits diamètres et peuvent être perforées (Sano and Jansen, 2006; Sano et al., 2011). Les ponctuations connectant des cellules vivantes aux vaisseaux présentent une paroi épaisse et peuvent être bordées du côté des vaisseaux (Figure 25) (Carlquist, 2007a). Enfin, entre les cellules non conductrices (fibres et cellules du parenchyme), il est possible d'observer des champs de plasmodesmes dans les ponctuations (Barnett, 1982).

Une ponctuation de vaisseau est constituée de deux cavités de part et d'autre de la paroi primaire résiduelle. Ces deux cavités forment la chambre de la ponctuation et sont bordées par des extensions de la paroi secondaire, les bordures.

La paroi primaire résiduelle est nommée membrane de la ponctuation. Elle est la résultante des parois primaires et de la lamelle moyenne des cellules adjacentes. Lors du processus de mort programmée de la cellule, cette paroi va être modifiée, notamment par des processus d'hydrolyses (Schmid and Machado, 1968). L'hydrolyse de la paroi des ponctuations augmenterait leur perméabilité. Lors de ces processus de maturation, ces structures deviennent moins denses aux électrons. Lorsque les processus de maturation se finissent, les ponctuations des vaisseaux permettent à l'eau de circuler d'un vaisseau à l'autre. De plus, ces structures limitent la propagation de l'embolie et elle représente le point le plus probable d'entrée d'air dans un vaisseau.

c. Composition des membranes de ponctuations

Peu de choses sont connues sur la maturation et donc sur la composition de la membrane de la ponctuation. Les membranes des ponctuations sont supposées être des parois primaires constituées de micro-fibrilles de cellulose entourées d'une matrice d'hémicelluloses et de pectines (Bauch et al., 1972). Si la présence de cellulose dans les ponctuations semble être admise notamment car des micro-fibrilles sont observables en *MEB*, la présence de pectines et d'hémicelluloses dans les ponctuations fait l'objet de débat. Les pectines comprennent cinq domaines : les homogalacturonanes (HG), les xylogalacturonanes (XGA), les apiogalacturonanes (AGA), les rhamnogalacturonanes II (RG-II), et les rhamnogalacturonanes (RG-I) (Caffall and Mohnen, 2009). Les pectines influencent la porosité et les propriétés mécaniques de la paroi notamment par leur niveau de méthylation et leur liaisons faibles (Carpita and Gibeaut, 1993). Ces molécules pourraient donc être importantes pour les aspects fonctionnels des ponctuations.

Lors de la maturation d'une ponctuation, les processus de dégradation et d'hydrolyse cibleraient les hémicelluloses et les pectines. Des gènes codant pour des polygalacturonases présentent d'ailleurs une expression tardive dans la xylogénèse chez *Populus tremula x tremuloïdes* (Hertzberg et al., 2001). En effet l'expression de ces gènes est augmentée lors des processus de mort programmée et pourrait coïncider avec les processus de maturation de la membrane de ponctuation. Lors des étapes de mort programmée des cellules du xylème, toutes les parois sont lignifiées et

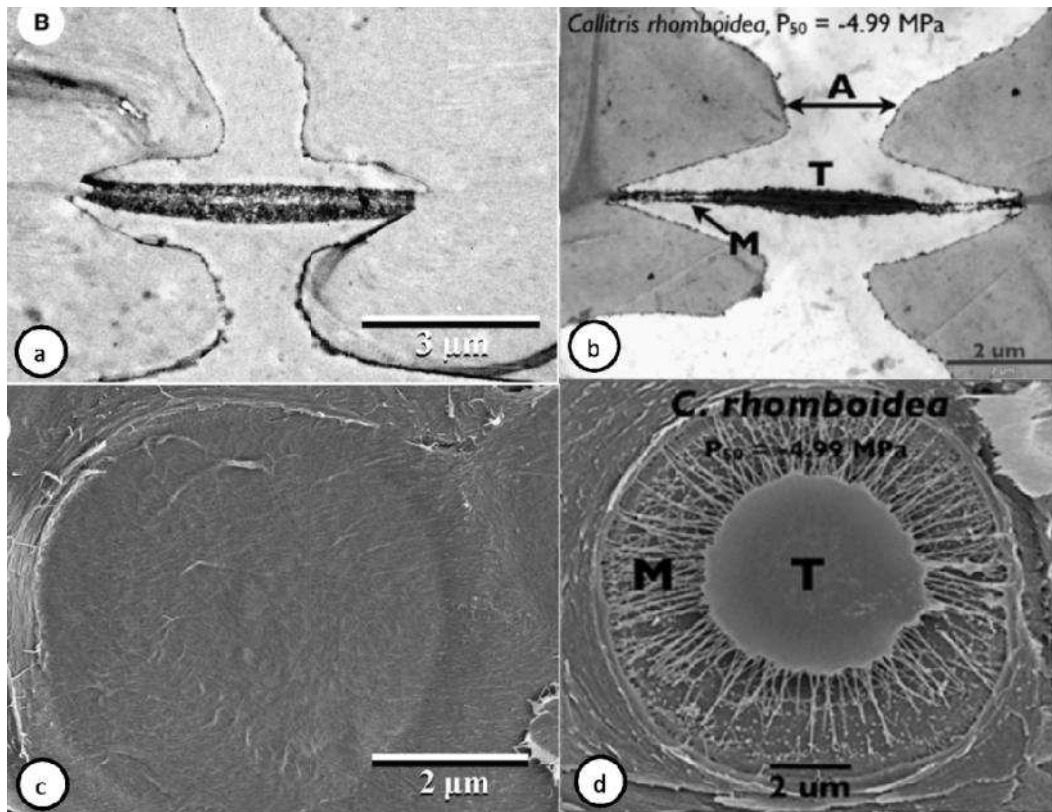


Figure 26 : Membranes de ponctuations entre vaisseaux observées en microscopie électronique. Ponctuation de *Laurus nobilis* observée sur coupe transversale en MET (a) et MEB (c). Ponctuation de *Callitris rhomboidea* observée sur coupe transversale en MET (b) et en MEB (d). Chez les angiospermes, la membrane présente un aspect homogène (a,c) alors que chez les gymnospermes la membrane présente un torus (T) entouré d'un margo (M) (b,d). A : ouverture de ponctuation (Jansen et al., 2009; Pittermann et al., 2010).

seules les ponctuations pourraient présenter des pectines accessibles aux polygalacturonases. La présence de pectines et d'hémicellulose résiduelles sur la membrane après ces étapes d'hydrolyses est hypothétique et peu de données dans la littérature sont disponibles. Aucune hémicellulose n'a été détectée chez *Citrus sinensis* (Alves et al., 2009). La présence de pectines reste non élucidée. De plus, la composition des membranes de ponctuations présente probablement une grande variabilité interspécifique. Le développement récent d'anticorps dirigés contre des motifs polysaccharidiques pariétaux devraient permettre d'élucider la composition de cette membrane. Au début de ce travail de thèse, de telles analyses n'avaient pas cours ; elles étaient envisagées dans le cadre d'un projet ANR grâce à une collaboration avec l'unité de recherche INRA BIA (Biopolymères, Interactions et Assemblages) de Nantes.

d. Variabilité structurelle des ponctuations

La structure des ponctuations des vaisseaux présente une grande variabilité interspécifique. Tout d'abord il existe un dimorphisme très fort entre les ponctuations de gymnospermes et celles d'angiospermes (Figure 26) (Choat et al., 2008). Les ponctuations des angiospermes présentent une membrane homogène alors que les gymnospermes ont des membranes hétérogènes (Figure 26). Le margo, à la périphérie présente une structure très poreuse et perméable alors que le torus, la partie centrale, est épaissie et imperméable car imprégnée de lignines (Figure 26b et d) (Bauch et al., 1972; Choat et al., 2008). De plus, les ponctuations de gymnospermes ont généralement un plus grand diamètre. Les dimensions des ponctuations présentent une grande variabilité interspécifique chez les angiospermes et gymnospermes (Sperry and Hacke, 2004; Jansen et al., 2009; Delzon et al., 2010). A titre d'illustration, *Populus tremula* présente des ponctuations avec un diamètre moyen de 8 μm alors que celles d'*Olea europea* mesurent 2,6 μm de diamètre en moyenne (Ennajeh et al., 2008). Chez les gymnospermes, la variabilité de taille sera plus grande avec des diamètres pouvant atteindre des valeurs de 8,7 μm chez *Araucaria laubenfelsii* (Pittermann et al., 2006) à 19 μm chez *Picea mariana* (Hacke and Jansen, 2009). On retrouve aussi de grandes variations de diamètre d'ouverture (1-4 μm chez les angiospermes, 2.2-7 μm chez les gymnospermes), d'épaisseur de membrane chez les angiospermes (60 nm à 700 nm) et d'épaisseur de torus chez les gymnospermes (250 nm à 950 nm).

Les ponctuations des angiospermes présentent aussi une morphologie variable, de circulaire à allongée (Figure 27) (Baas et al., 2004). Les ponctuations allongées sont dites scalariformes (Figure 27a). La longueur latérale de ce type de ponctuation est égale à la largeur de la face du vaisseau. Les ponctuations transitionnelles présentent la même morphologie mais leur longueur latérale est inférieure à la largeur de la face du vaisseau (Figure 27b). Ces types de ponctuations sont peu

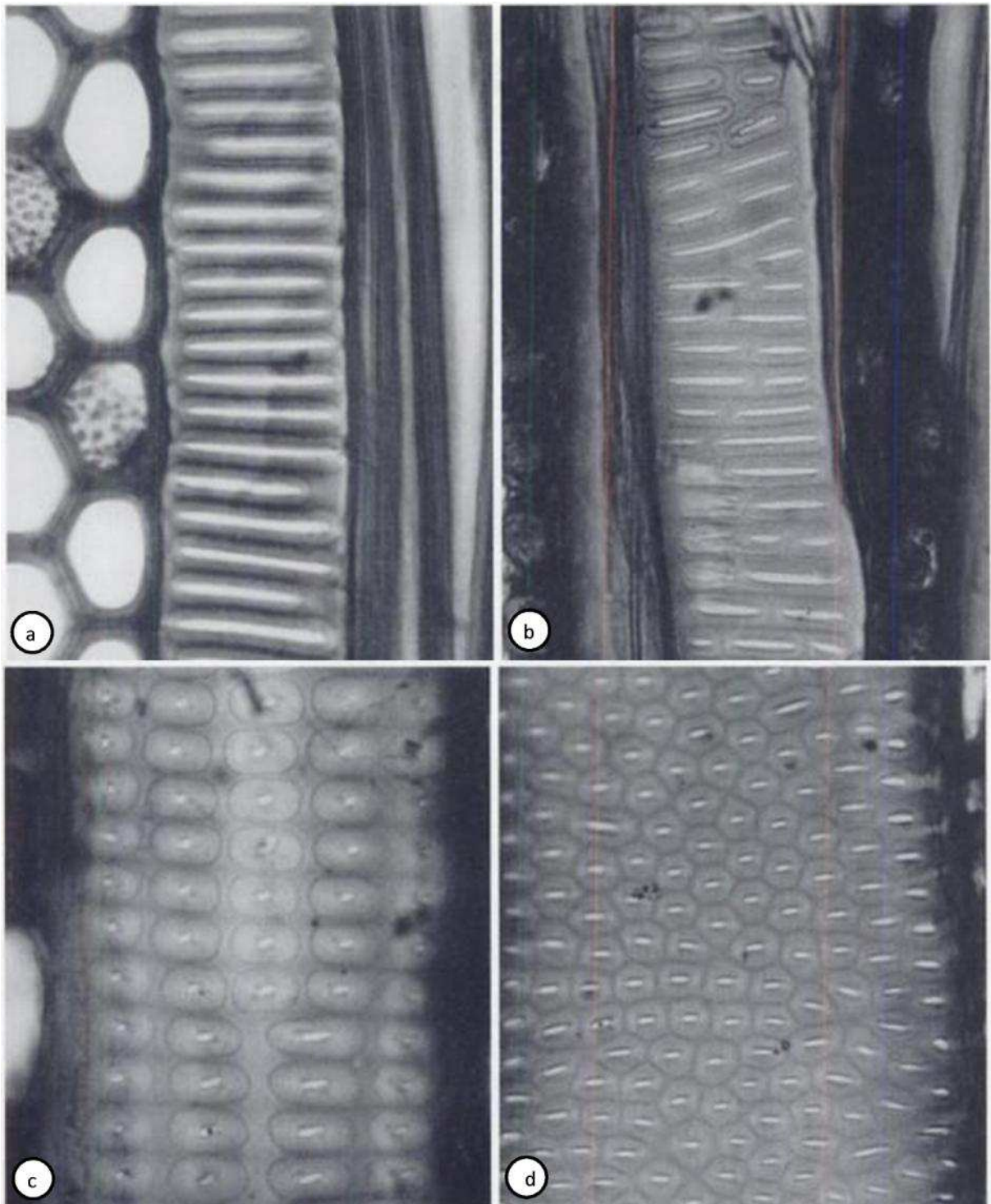


Figure 27 : Principaux types de ponctuations de vaisseaux chez les angiospermes observées sur coupes tangentielles en microscopie optique. (a) Ponctuations scalariformes chez *Magnolia grandiflora* (*Magnoliaceae*) ; (b) Ponctuations transitionnelles chez *Nothofagus antarctica* (*Fagaceae*) ; (c) Ponctuations opposées chez *Peridiscus lucidus* (*Peridiscaceae*) ; (d) Ponctuations alternées chez *Brosimum sp* (*Moraceae*). D'après Carlquist (1988).

communes chez les angiospermes. Les ponctuations opposées sont généralement circulaires et alignées en série horizontale (Figure 27c). Certaines ponctuations opposées peuvent avoir une morphologie ovale à elliptique. Dans la famille des *Magnoliaceae*, le genre *Magnolia* est caractérisé par des ponctuations scalariformes alors que le genre *Liriodendron* présente des ponctuations opposées. Les ponctuations alternées sont les ponctuations les plus fréquentes chez les angiospermes (Figure 27d). Elles sont généralement circulaires et présentent une disposition hélicoïdale (Carlquist, 2001). Les ponctuations scalariformes seraient des structures primitives, alors que les ponctuations alternées assureraient une meilleure résistance mécanique des parois des vaisseaux (Carlquist, 2001). Les ponctuations scalariformes sont présentes dans le clade des *Magnoliids*, notamment dans les familles *Magnoliaceae*, *Aristolochiaceae* et *Piperaceae*. Toutefois, les ponctuations scalariformes sont aussi présentes dans des familles comme les *Begoniaceae* et *Betulaceae*. Ces variations de morphologie peuvent se retrouver à l'échelle interspécifique mais aussi au sein du bois d'une même espèce comme chez *Fagus sylvatica*. En effet, si dans cette espèce les ponctuations alternées sont les plus fréquentes, il y a aussi des ponctuations scalariformes.

e. Tori et pseudo-tori chez les angiospermes

Bien que les tori soient des structures communément admises comme caractéristiques des gymnospermes, ils ont été observés dans certaines familles d'angiospermes comme les *Cannabaceae*, *Oleaceae*, *Rosaceae*, *Ulmaceae* et *Thymelaeaceae* (Jansen et al., 2007; Rabaey et al., 2008a; Rabaey et al., 2008b). Si ces structures ne sont présentes que dans certaines familles, des analyses phylogénétiques ont montré que les tori pouvaient se retrouver dans seulement un genre d'une famille ou encore dans seulement une espèce d'un genre. Cette forte disparité phylogénétique illustre l'homoplasie de ce caractère chez les angiospermes. A titre d'exemple, dans la famille des *Oleaceae*, les espèces *Chionanthus retusa*, *Osmanthus fragrans*, *Picconia azorica* et *Picconia excelsa* présentent des tori (Figure 28) (Rabaey et al., 2008a) alors que les espèces *Chionanthus africanus* et *Chionanthus laxiflora* n'en présente pas. Or, si les genres *Picconia* et *Osmanthus* sont phylogénétiquement proches, le genre *Chionanthus* est phylogénétiquement plus éloigné. Les genres d'*Oleaceae* *Forestiera*, *Haenianthus*, *Noronhia*, et *Olea* présentant des relations de parenté fortes avec le genre *Chionanthus* ne possèdent pas de torus. Dans la famille des *Rosaceae*, seul le genre *Cercocarpus* semble contenir des espèces porteuses de tori. L'occurrence d'espèces porteuses de tori et d'espèces n'en présentant pas dans des genres relativement importants comme *Celtis* (*Cannabaceae*) et *Ulmus* (*Ulmaceae*) supporte l'hypothèse d'homoplasie des tori (Jansen et al., 2007). Les tori semblent être fortement associés à des bois à zone poreuse et ils sont présents sur des ponctuations connectant des cellules conductrices (Rabaey et al., 2008b). Ces structures se retrouvent au niveau du bois d'été, sur les parois des éléments conducteurs de faible dimension

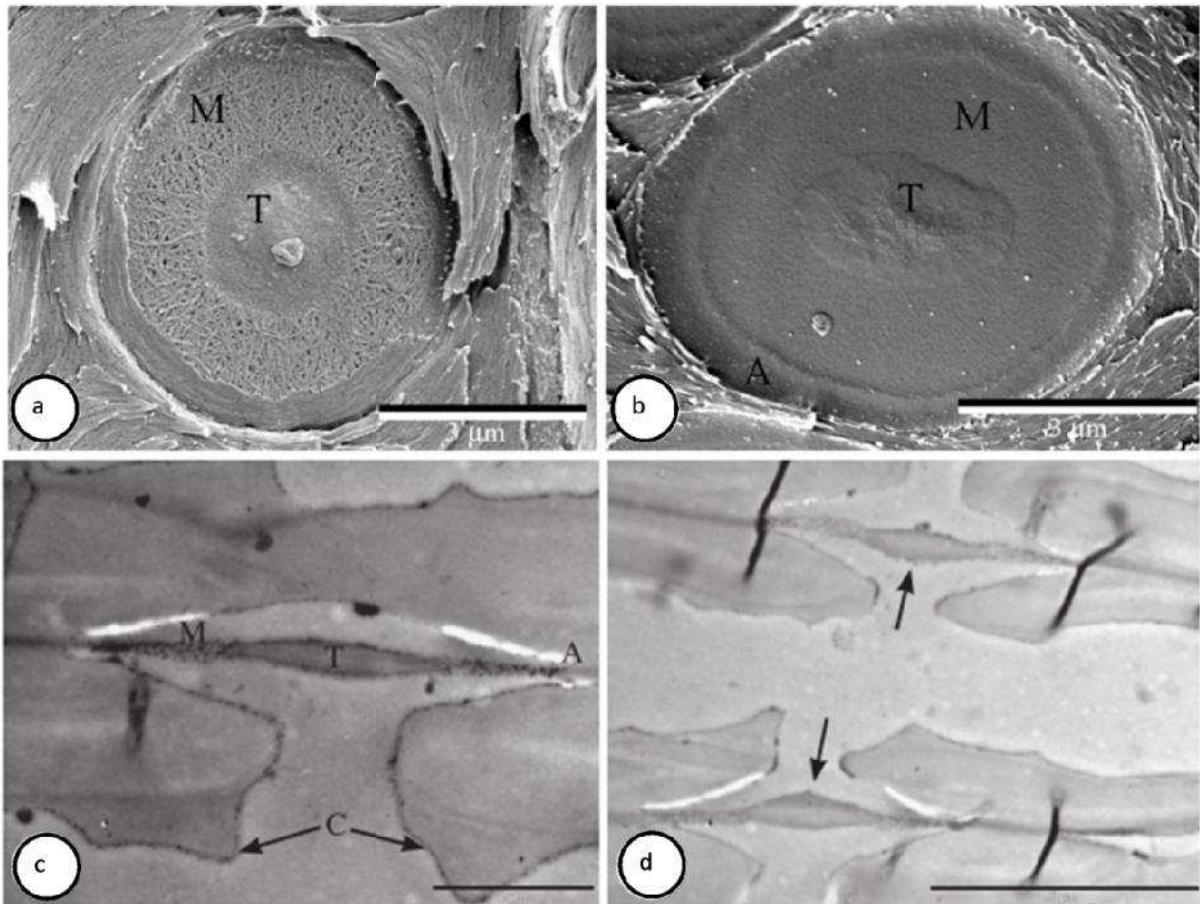


Figure 28 : Ponctuations avec tori dans la famille des *Oleaceae* observées en microscopie électronique. Ponctuation d'une trachéide de *Osmanthus fragrans* observée en MEB (a). Ponctuation d'une trachéide de *Picconia excelsa* observée en MEB (b). Ponctuation de trachéide de *Chionanthus retusa* sur coupe longitudinale observée en MET (c-d). T : torus, M : margo, A : anneau, C : couche d'ornementation de trachéide. Echelles : (a) et (b) : 3 μm , (c) : 2 μm , (D) : 5 μm . D'après Rabaey et al. (2008).

comme les trachéides ou les petits vaisseaux et elles sont souvent associées à des épaissement hélicoïdaux (Rabaey et al., 2008b). Les tori sont généralement présents chez des espèces de régions tempérées et sont absents des espèces à bois à pores diffus de régions tropicales. Ainsi les espèces des genres *Celtis* et *Ulmus* dépourvues de tori présentent un bois à pores diffus et une origine tropicale à subtropicale (Jansen et al., 2007).

Chez certaines espèces d'angiospermes il est possible d'observer des pseudo-tori (Jansen et al., 2004a). Ces structures sont plus fréquentes que les tori et présentent des différences structurales avec ces derniers. La caractéristique clé des pseudo-tori est qu'ils sont traversés par des plasmodesmes (Figure 29a) (Lachaud and Maurousset, 1996; Jansen et al., 2004a; Rabaey et al., 2008a). De plus les pseudo-tori présentent une distribution variable et irrégulière à l'échelle du bois. A la différence des tori, les pseudo-tori connectent aussi des cellules non conductrices (Barnett, 1982; Lachaud and Maurousset, 1996; Rabaey et al., 2008a). Enfin, l'épaississement de membrane du pseudo-torus n'est pas systématiquement centré comme le torus et il est même possible d'observer deux épaissements sur une même membrane (Figure 29b-d). Le torus des angiospermes aurait un rôle de scellé pour limiter la propagation de l'embolie similaire à celui des gymnospermes (Jansen et al., 2004b). Il est peu plausible que les pseudo-tori présentent une fonction similaire au tori de part leur position non centrale sur la membrane et leur présence sur différents types cellulaires. La fonction des pseudo-tori n'est pas élucidée et les hypothèses actuellement proposées suggèrent que les pseudo-tori sont impliqués dans le développement des fibres, trachéides et vaisseaux, permettant de les isoler des autres cellules afin d'éviter les fuites d'enzymes autolytiques lors des processus de mort programmé (Barnett, 1982). Ces hypothèses sont en débat notamment car elles impliqueraient une obturation des plasmodesmes traversant les pseudo-tori. Or, des vestiges de plasmodesmes ouvert traversant un pseudo-torus sont observés chez *Sorbus torminalis* et certaines espèces d'*Oleaceae* (Lachaud and Maurousset, 1996; Rabaey et al., 2008b).

Des pseudo-tori ont été observés dans les familles *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Oleaceae*, *Grossulariaceae*, *Pittosporaceae* et *Ericaceae* (Barnett, 1982; Lachaud and Maurousset, 1996; Jansen et al., 2007; Rabaey et al., 2008a; Rabaey et al., 2008b). Chez les *Rosaceae*, des pseudo-tori sont observés dans presque tous les genres exceptés *Aruncus* et *Cercocarpus* (Jansen et al., 2007). L'absence de pseudo-tori dans le genre *Cercocarpus* serait due à la présence des tori dans ce genre et l'absence de pseudo-tori chez *Aruncus* est expliquée par les auteurs par l'absence de trachéides dans ce genre. A l'échelle du xylème, les pseudo-tori semblent être associés à des bois portant des trachéides. Ces structures sont d'ailleurs plus fréquentes entre les fibres et trachéides bien qu'elles soient aussi observées entre vaisseaux et fibres/trachéides, et entre cellules du parenchyme et fibres/trachéides. Quand un pseudo-torus se développe entre une cellule du parenchyme et un élément conducteur, il ne se développe que du côté de l'élément conducteur

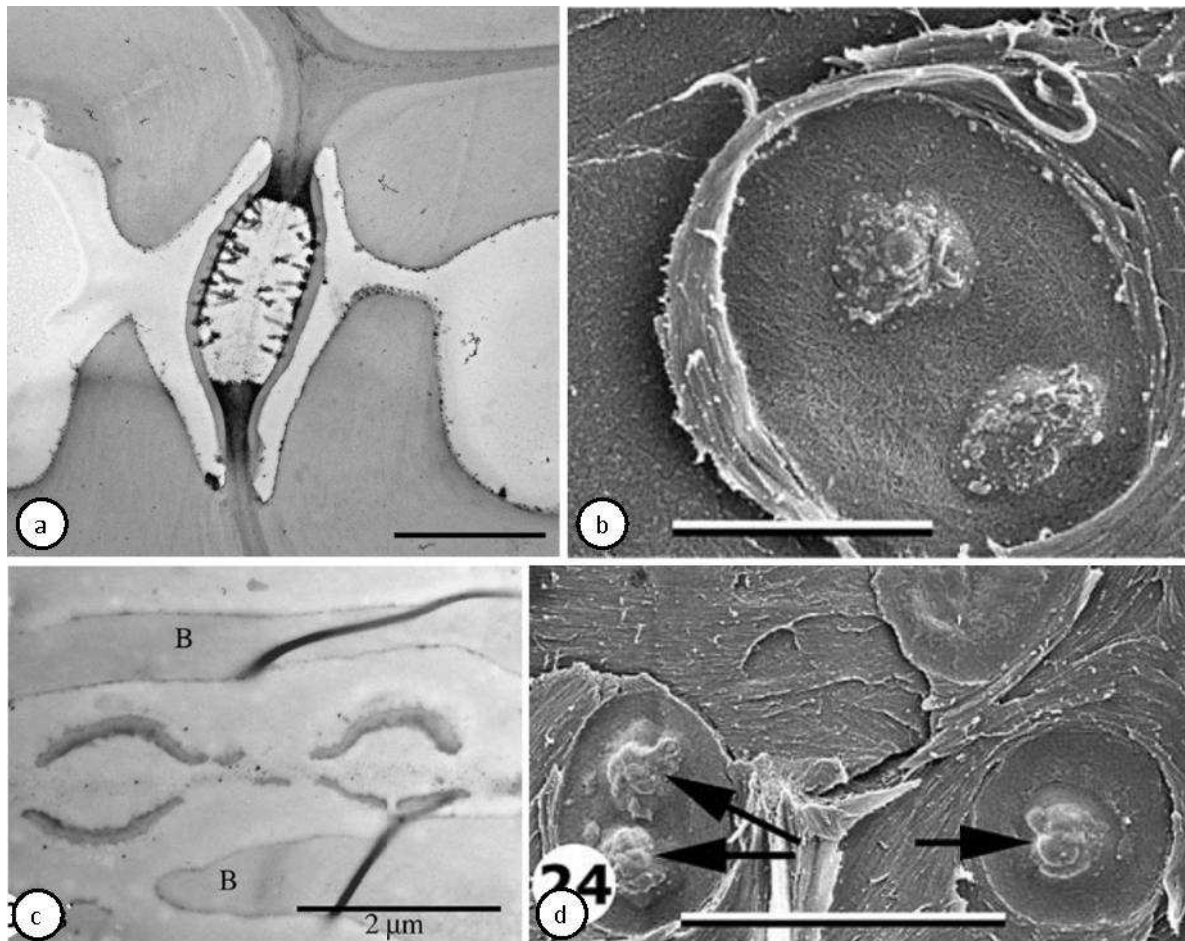


Figure 29 : Ponctuations d'angiospermes avec pseudo-tori observées en microscopie électronique. Ponctuation de fibre de *Sorbus aria* (Rosaceae) observée en MET (a). Le pseudo torus est apposé de part et d'autre de la membrane. Les plasmodesmes traversant la membrane de ponctuation apparaissent avec une forte densité aux électrons. Ponctuation de trachéides de *Stephanandra incisa* (Rosaceae) présentant deux pseudo-tori observée en MEB (b). Ponctuation de *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) présentant deux pseudo-tori observé en MET (c). Ponctuations de trachéides de *Holodiscus dumosus* (Rosaceae) portant des pseudo-tori (d). Les pseudo-tori sont indiqués d'une flèche. Echelle : (A), (B) et (C) : 2 μ m, (D) : 5 μ m. D'après (Jansen et al., 2007; Rabaey et al., 2008b).

alors qu'une couche supplémentaire est apposée du côté de la cellule du parenchyme (Barnett, 1982; Rabaey et al., 2008b). La formation de pseudo-tori est décrite par Rabaey *et al.* (2008). Sur quatre espèces de familles différentes (*Malus yunnanensis*, *Rosaceae*; *Ligustrum vulgare*, *Oleaceae*; *Pittosporum tenuifolium*, *Pittosporaceae*; *Vaccinium myrtillus*, *Ericaceae*), ils montrent que le développement des pseudo-tori suit un schéma similaire sans différence interspécifique.

f. Ornements des ponctuations d'angiospermes

Certaines espèces d'angiospermes présentent aussi des ornements à l'intérieur de la chambre de la ponctuation (Figure 30) (Jansen et al., 2003). Ces ornements sont des excroissances de la paroi secondaire et montrent une différence de densité aux électrons avec cette dernière, ce qui suggère une composition différente. Les ornements sont systématiquement présentes dans les espèces des ordres de Myrtales et Gentianales, et caractérisent des clades au sein d'ordre comme les Brassicales, les Caryophyllales et les Malvales (Jansen et al., 2003). Ainsi chez les Brassicales, elles sont présentes dans les familles *Brassicaceae*, *Capparaceae* et *Cleomaceae*. La plus grande famille présentant des ponctuations à ornements est *Fabaceae* bien que les espèces des taxons les plus basaux n'en portent pas. Dans certaines familles, la présence d'ornementation peut présenter une plus grande variabilité taxonomique notamment chez les *Rosaceae*, les *Oleaceae* et les *Boraginaceae* (Jansen et al., 2003). A titre d'exemple, seules quelques espèces du genre *Spiraea* et *Hemiptelea* ont des ornements dans la famille des *Rosaceae*. La répartition phylogénétique de ce caractère suggère une forte homoplasie avec au moins cinq origines des ponctuations à ornements chez les angiospermes dans les Proteales, les Caryophyllales, les eurosids I, les eurosids II et euasterids I. Dans le genre *Hemiptelea* (*Rosaceae*), *Daphne* et *Wikstroemia* (*Thymelaeaceae*) les espèces avec des ornements n'ont pas de tori et inversement. Ces structures seraient mutuellement exclusives (Dute et al., 1992; Dute et al., 2001; Jansen et al., 2007). Des analyses dans d'autres familles sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. D'autre part, il y a une forte corrélation entre la présence de ponctuations ornementées et la présence de perforations simples chez les espèces. En effet, les ornements sont présentes dans les clades qui sont caractérisées par la dominance ou l'exclusivité des perforations simples comme les Caryophyllales, les Gentianales, les Lamiales, Solanales, Brassicales, Malvales, Myrtales, Zygophyllales, Fabales et Rosales. Quelques exceptions existent. A titre d'exemple, des espèces des genres *Luma* et *Igni* (Myrtales) présentent des ornements et les perforations scalariformes (Jansen et al., 2003). *Neomyrtus pedunculata* présente même des perforations scalariformes porteuses d'ornements.

Les ornements des ponctuations semblent être associées à des climats secs (Jansen et al., 2004a). Ainsi sur 550 espèces ligneuses de la flore européenne, 115 espèces ont des ponctuations

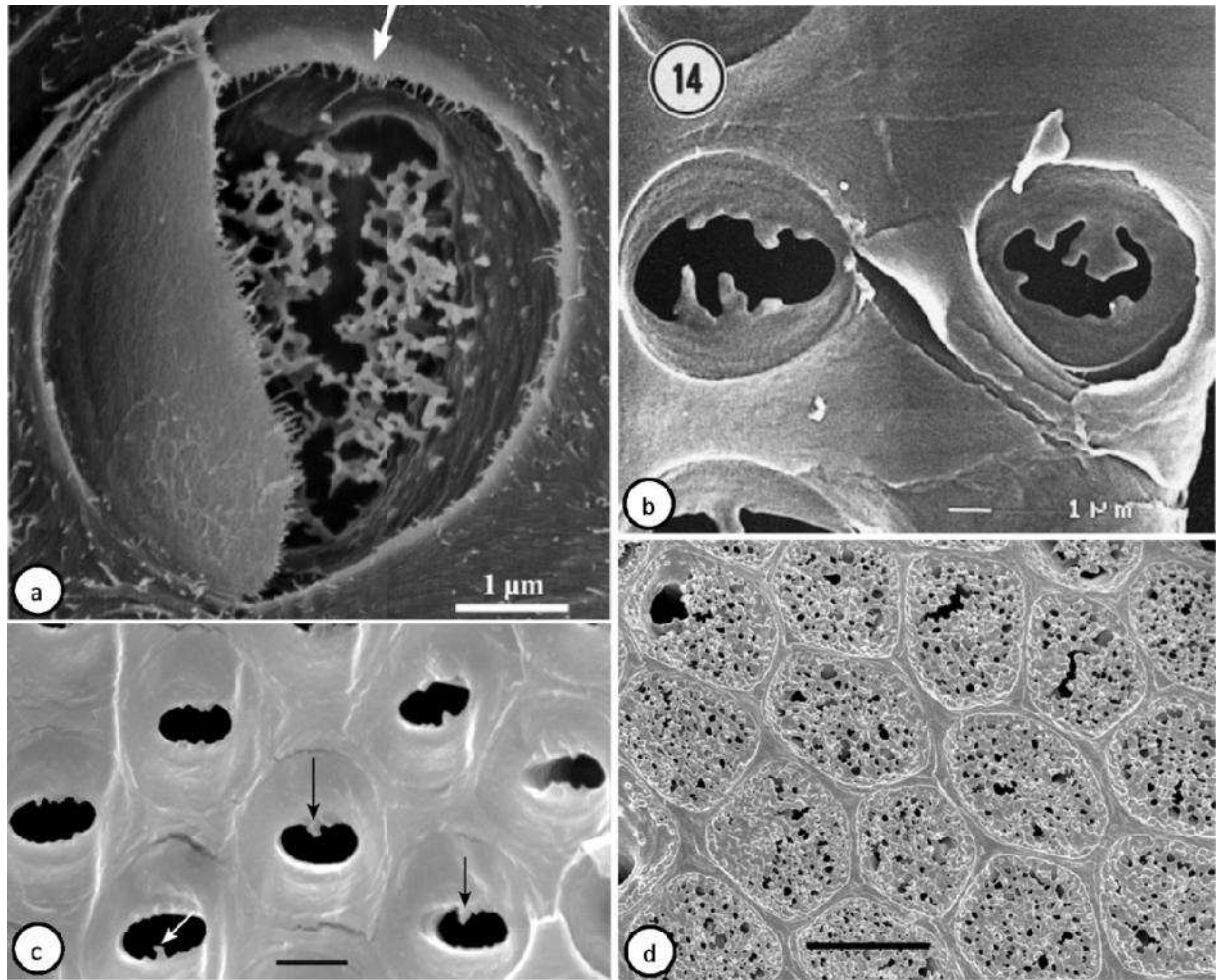


Figure 30 : Ponctuations à ornements plus ou moins développées observées en MEB. Ponctuation d'*Eucalyptus camaldulensis* (*Myrtaceae*) portant des ornements ramifiées développées (a). La membrane de la ponctuation est déchirée et une partie résiduelle est sur la gauche de l'image. Ponctuations de *Shepherdia argentea* (*Elaeagnaceae*) présentant des ornements irréguliers (b). Ponctuations de *Fraxinus americana* (*Oleaceae*) avec des ornements très peu développés (c). Les ornements sont indiqués d'une flèche. Ponctuations de *Pisonia cuspidata* (*Nyctoginaceae*) présentant des ornements formant un réseau complexe de ramification qui occulte l'aperture (d). Echelle : (a) et (b) : 1 µm, (c) : 2 µm, (d) : 5 µm. (Jansen et al., 2000; Jansen et al., 2004b; Sano and Jansen, 2006).

ornementées et 8% de ces espèces proviennent d'un habitat mésique, 65% proviennent d'un habitat sec et 27 % d'un habitat intermédiaire (Baas and Schweingruber, 1987; Jansen et al., 2003). Des tendances similaires sont observées sur la flore de Californie (Carlquist, 2001). La forte fréquence de ces structures dans les habitats secs s'expliquerait par le fait qu'elles confèreraient une plus grande résistance à l'embolie (Zweypfenning, 1978; Jansen et al., 2003; Choat et al., 2004).

IV PROPRIETES HYDRAULIQUES DU XYLEME ET EFFICIENCE DU TRANSPORT DE L'EAU

1) Les variables hydrauliques

La conductance traduit l'efficacité de transport d'un organe. A l'échelle d'un segment de tige, la conductance (K , $\text{mol. s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$) peut être calculée comme étant le ratio entre le débit D à travers ce segment et la différence de potentiel hydrique entre les deux extrémités $\Delta\psi$.

$$K = \frac{D}{\Delta\Psi}$$

Elle peut être déterminée directement par un débitmètre (ex : Xyl'em, Bronkhorst) ou encore par une balance de précision. Le débitmètre mesure le flux d'eau traversant un segment de tige donnée en réponse à une différence de potentiel appliquée entre ces deux extrémités. La conductance peut être exprimée par unité de longueur du segment mesuré ; et on calcule ainsi la conductivité hydraulique (K_h ; $\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$).

$$K_h = \frac{D}{\Delta\Psi} \times L$$

où L (m) est la longueur du segment étudié. Comme K_h dépend de la surface de section de bois fonctionnel de la tige (A_s , m^2), la conductivité hydraulique divisée par A_s permet d'obtenir la conductivité spécifique (K_s , $\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$) de la tige qui traduit la capacité d'un élément de longueur et de section unitaires à conduire un flux hydrique.

$$K_s = \frac{D \times L}{\Delta\Psi \times A_s} = \frac{K_h}{A_s}$$

2) Propriétés du xylème contrôlant l'efficacité hydraulique

a. Structure du xylème et conductance hydraulique

Le transport de la sève est réalisé dans les vaisseaux ; leur structure conditionne donc l'efficacité de transport. La conductance d'un segment de tige est dépendante du nombre de vaisseaux ainsi que de leurs dimensions. Ainsi, le diamètre des vaisseaux conditionne fortement leur conductance selon la loi de Hagen-Poiseuille. La longueur des vaisseaux influe aussi la conductance car elle détermine la fréquence des terminaisons de vaisseaux qui représentent une autre source importante de résistance au flux. Les ponctuations modulent cette deuxième part de résistance ; elles représentent une importante résistance au flux.

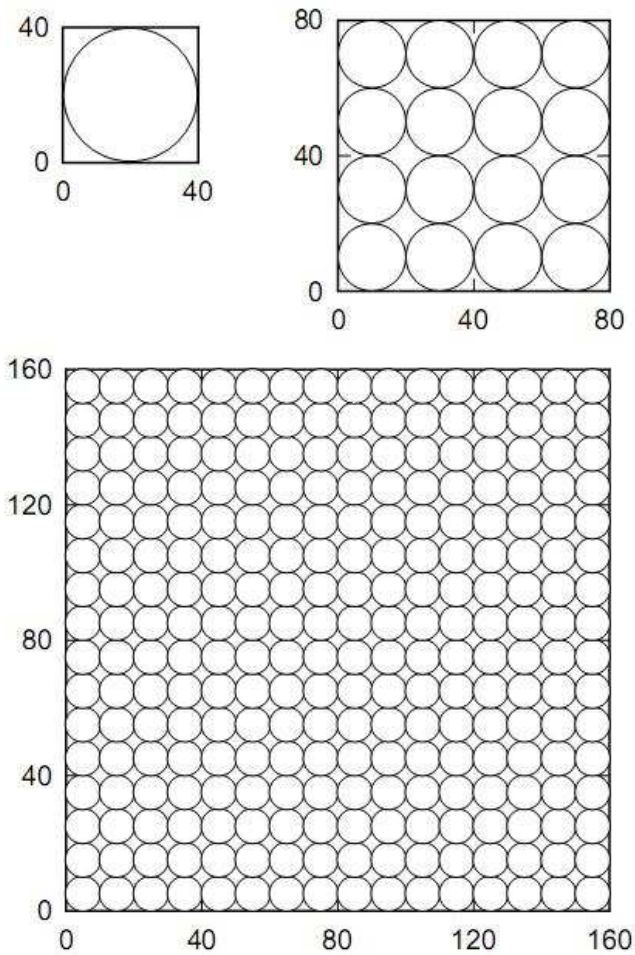


Figure 31 : Illustration de la loi de Hagen Poiseuille calculant la conductance de conduits de différents rayons. Un vaisseau de 40 μm de diamètre présente une conductance équivalente à 16 vaisseaux de 20 μm et 256 vaisseaux de 10 μm (Tyree and Zimmermann, 2002).

La loi de Hagen-Poiseuille décrit l'écoulement laminaire d'un liquide dans un conduit cylindrique en fonction de son diamètre :

$$K_s = \frac{r^4 \pi}{8\eta}$$

Où r est le rayon du conduit et η la viscosité du liquide. Cette loi a été largement utilisée pour estimer la conductance d'un segment de tige d'après le rayon des vaisseaux et montre des corrélations fortes avec les conductances mesurées (Tyree and Zimmermann, 2002). De plus, les mesures de conductance sur un seul vaisseau coïncident avec la loi de Hagen-Poiseuille (Zwieniecki et al., 2001). L'importance du diamètre des vaisseaux semble donc considérable car la conductance est proportionnelle à leur rayon à la puissance quatre. Cette loi souligne donc l'importance des vaisseaux de grand diamètre dans l'efficacité d'un segment de bois (Figure 31). Ainsi, un vaisseau de 40 μm de diamètre présente une conductance équivalente à 16 vaisseaux de 20 μm et 256 vaisseaux de 10 μm (Tyree and Zimmermann, 2002). Des vaisseaux de diamètre important présentent un avantage évolutif car ils nécessitent un investissement de carbone moindre pour une efficacité équivalente (Figure 31) (Pittermann, 2010). Un débit plus important permet aussi d'augmenter le taux de photosynthèse (Brodribb et al., 2002). L'évolution des plantes vasculaires montre qu'il y a eu une augmentation d'un facteur 60 du diamètre maximum des conduits depuis le Silurien (Pittermann, 2010). Si les espèces du Silurien présentaient des diamètres de conduit de 5-8 μm , la variabilité de taille de conduit a fortement augmenté pour atteindre des valeurs maximum de quelques centaines de microns de diamètre chez certaines espèces. Toutefois, la variabilité de diamètre des conduits chez les trachéophytes actuels illustre le fait que les vaisseaux de forts diamètres ne représentent pas systématiquement un avantage sélectif. Des vaisseaux de forts diamètres sont notamment des structures mécaniques moins résistantes que des vaisseaux de petites dimensions et sont aussi plus sensibles à l'embolie hivernale. D'autre part, les dimensions plus faibles des trachéides des gymnospermes par rapport aux vaisseaux des angiospermes leur confèreraient théoriquement une conductivité inférieure (Tyree and Zimmermann, 2002). Pourtant, il a été montré que les gymnospermes présentaient une conductivité spécifique supérieure aux angiospermes (Pittermann et al., 2005).

La loi de Hagen Poiseuille permet ainsi d'estimer la conductivité spécifique d'un segment de tige par une conductivité spécifique théorique (K_{theo}). Concrètement, on estime l'aire des vaisseaux et on calcule le rayon correspondant. Cependant, si cette loi peut s'avérer être une bonne approximation pour des rameaux courts, elle n'estime que la conductivité des lumens (K_{lumen}) et est généralement supérieure à la conductivité mesurée (Tyree and Zimmermann, 2002; Sperry et al., 2005; Hacke et al., 2006). Ainsi, plus les rameaux sont longs, plus l'écart entre la conductivité

théorique et la conductivité observée se creuse. En effet, la résistance d'un rameau inclut la résistance des lumens mais aussi celles des terminaisons de vaisseaux. La résistivité ($1/K_{\text{terminaison}}$) des terminaisons de vaisseaux compte en moyenne pour 50% de la résistivité totale d'un rameau (Lancashire and Ennos, 2002; Sperry et al., 2005; Choat et al., 2008). L'augmentation de longueur des vaisseaux permet ainsi d'augmenter l'efficacité de transport en diminuant les résistances associées aux terminaisons de vaisseaux (Sperry, 2003). De plus, la diminution des barres latérales au niveau des perforations et le remplacement des perforations scalariformes par des perforations simples tend à optimiser l'efficacité de conduction (Sperry, 2003).

$$K_s = \frac{1}{K_{\text{lumen}}} + \frac{1}{K_{\text{terminaison}}}$$

Ce sont les ponctuations qui permettent le passage de la sève et réduisent ainsi la résistance au flux de la terminaison des vaisseaux (Hacke et al., 2006; Pittermann, 2010). La structure des ponctuations est à l'origine de la plus grande conductivité spécifique des gymnospermes par rapport aux angiospermes (Pittermann et al., 2005). En effet le margo des ponctuations de gymnospermes présente une porosité importante, de l'ordre du micron, qui représentera une résistance moindre par rapport aux pores homogènes des membranes des ponctuations des angiospermes (Pittermann et al., 2005; Pittermann, 2010). Les pores dans les ponctuations des angiospermes présentent une taille de 5 à 420 nm (Choat et al., 2008). En conséquence, la structure des ponctuations des gymnospermes compense la dimension des trachéides (Pittermann et al., 2005). Ainsi la conductivité des terminaisons de vaisseaux peut être expliquée par des résistances associées aux ponctuations

$$K_{\text{terminaison}} = \frac{N_{\text{ponctuation}} \times K_{\text{ponctuation}}}{2}$$

Avec $N_{\text{ponctuations}}$ le nombre de ponctuation sur la paroi du vaisseau. La résistance que représente la ponctuation est décrite par l'addition de la résistance de l'ouverture de la ponctuation et de sa membrane. Cette dernière résistance dépend de la porosité de la membrane, la taille des pores et la surface de membrane (Sperry and Hacke, 2004; Pittermann, 2010).

Ce modèle théorique d'efficacité d'un vaisseau dépendant de son diamètre et de sa longueur présente toutefois quelques limites car il est important de garder à l'esprit que le xylème est un tissu hautement redondant. Si un vaisseau ne se termine jamais seul, il sera connecté à plusieurs vaisseaux par des ponctuations tout le long de son trajet et on ne peut pas limiter la conductance hydraulique d'un segment de tige à un système purement linéaire. Les micro-moulages de vaisseaux (Figure 16f) mettent en évidence la large distribution des ponctuations tout le long du vaisseau considéré.

Au sein d'un individu, la taille des vaisseaux n'est pas homogène. Le diamètre des vaisseaux tend à être corrélé avec le diamètre de la tige (Olson and Rosell, 2013). On observe un accroissement basal des diamètres de vaisseaux lié à la longueur du trajet hydraulique. Ainsi, les branches en amont du trajet hydraulique tendent à avoir des vaisseaux de plus grandes dimensions (Bettiati et al., 2012). A l'échelle de l'arbre entier, le flux de l'eau est fonction de l'addition des résistances des vaisseaux traversés :

$$F = \frac{\pi \sum r_i^4}{8\eta} \frac{-\Delta\Psi_i}{\Delta z_i}$$

Avec r_i le rayon du vaisseau, Δz_i la longueur du vaisseau et $\Delta\psi_i$ la différence de potentiel hydrique entre le sommet et la base du vaisseau. Afin de répondre équitablement à la demande évaporative des feuilles de la couronne de l'arbre, la résistance totale du trajet hydraulique de l'eau doit être constante quelque soit la longueur du trajet. La loi de Poiseuille implique qu'un conduit de longueur supérieure à un autre de même diamètre aura une plus grande résistance. Ainsi, afin de compenser l'effet de la longueur du trajet hydraulique sur sa résistance, les arbres tendent à avoir des vaisseaux de plus grands diamètres à la base que dans les parties apicales (Olson and Rosell, 2013). La même tendance est observable sur la longueur d'un vaisseau (Jacobsen et al., 2012). Cette compensation explique que les segments de tige ayant des plus grands diamètres présentent des vaisseaux à plus fort diamètre (Bettiati et al., 2012).

b. Contrôle ionique de la conductance des vaisseaux

Quand l'efficacité de transport est estimée, on assimile le comportement hydraulique de la sève à celui de l'eau en raison des faibles concentrations ioniques. Toutefois, des modifications de la concentration ionique de la sève induit des changements dans la conductivité hydraulique (Figure 32)(Zimmermann, 1978; van Ieperen et al., 2000; Zwieniecki et al., 2001; Cochard et al., 2010b). L'effet de la composition ionique de la sève sur la conductivité est d'abord interprété par des phénomènes de gonflement et de rétraction des pectines au niveau des ponctuations. Les pectines sont des polymères chargés négativement et formeraient un hydrogel. La perfusion d'eau déminéralisée diminuerait la concentration ionique dans le voisinage de l'hydrogel et induirait son gonflement selon l'effet de Donnan. Ce gonflement diminuerait le diamètre des nano-pores des membranes de ponctuations et ainsi la conductance du segment de tige étudié (Zwieniecki et al., 2001). Inversement, une augmentation de la concentration en potassium de la sève augmenterait la porosité des ponctuations et serait à l'origine d'une augmentation de la conductance (Figure 32).

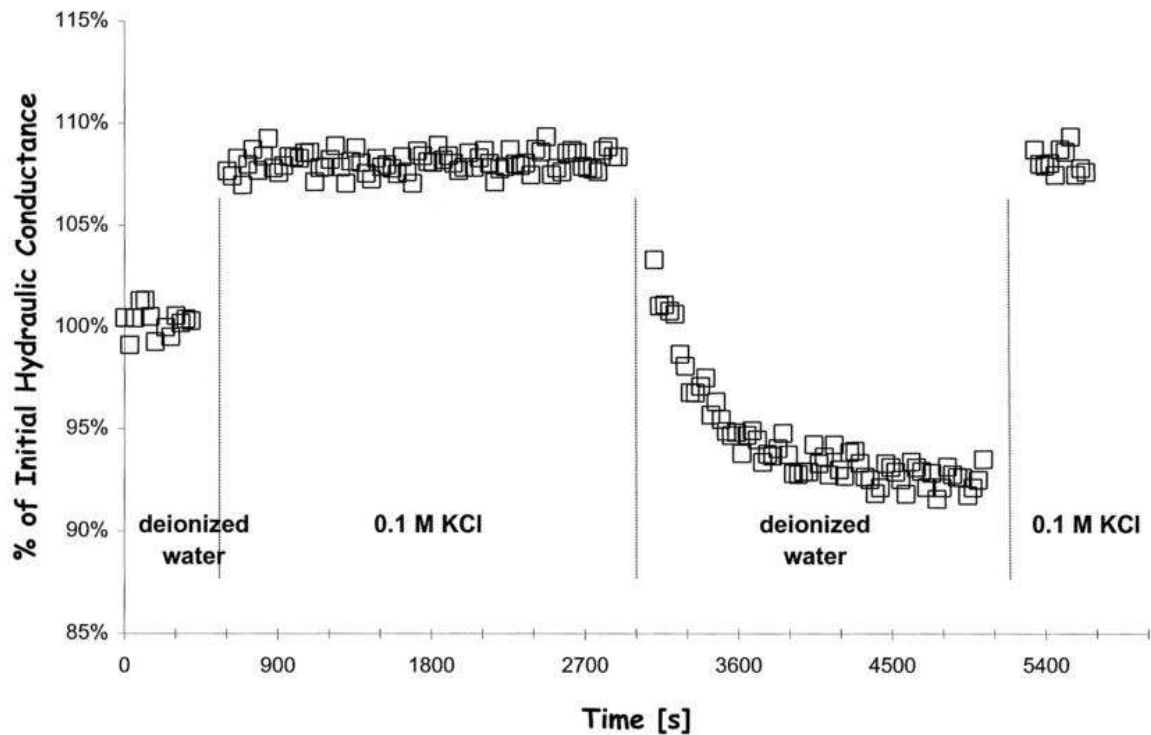


Figure 32 : Effet de la force ionique de la sève sur la conductance. La conductance hydraulique est mesurée sur des segments de tige de 20 cm de long de Chrysanthème. De l'eau déionisée et une solution de KCl à 0.1 M sont perfusés successivement à une pression de 40 kPa. La perfusion de KCl induit une augmentation d'environ 7% de la conductance. Cet effet est réversible. D'après (van Ieperen et al., 2000)

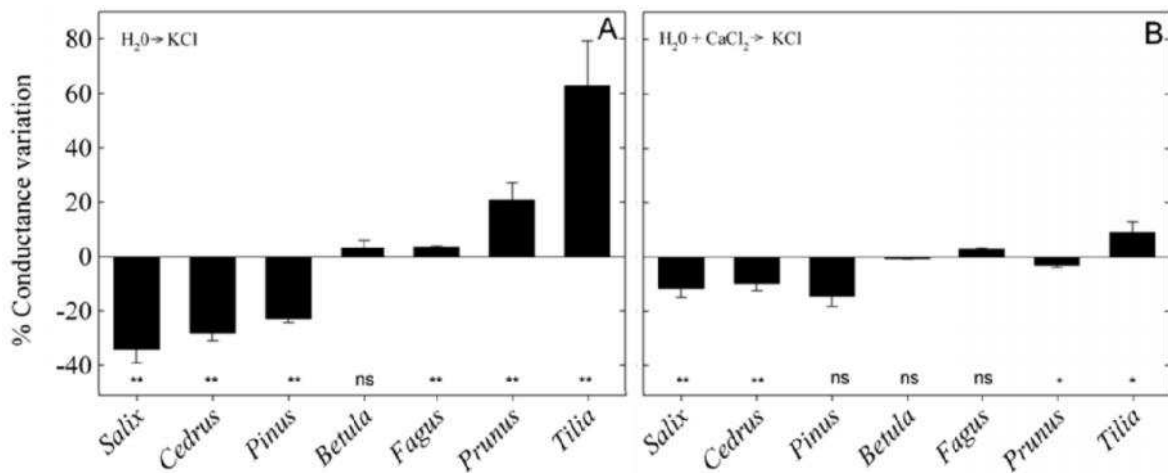


Figure 33 : Variabilité interspécifique de l'effet ionique de la sève sur la conductance. Les segments de tiges sont perfusés avec de l'eau déionisée puis avec une solution de KCl 50mM (a). Le calcium ajouté à l'eau a un effet inhibiteur sur les variations de conductance générées par les variations ioniques (b). Les segments de tiges sont perfusés avec une solution de CaCl_2 1mM puis avec une solution de KCl 50mM. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=5) ** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$, ns : effet non significatif. D'après (Cochard et al., 2010b)

L'effet ionique de la sève sur la conductance est montré comme dépendant de la longueur de l'échantillon chez *Laurus nobilis* (Gascó et al., 2008). L'effet est modéré sur des échantillons courts et devient maximum au-delà de 12 cm. Pour cette longueur plus de 80 % des vaisseaux sont fermés. Ces résultats s'expliquent par une implication des ponctuations dans l'effet ionique de la sève sur la conductance. En effet, plus la résistance des ponctuations s'accroît, plus l'effet ionique semble être important. De plus, l'effet ionique de la sève sur la conductance est dépendant de la concentration.

Les espèces *Chrysanthemum grandiflorum*, *Acer saccharum*, *Laurus nobilis*, *Fraxinus americana*, *Fagus sylvatica*, *Prunus avium* et *Tilia platyphyllos* montrent une augmentation de la conductance après perfusion de KCl et sont donc en accord avec le paradigme proposé par Zwieniecki et al., (2001). Des variations interspécifiques de 2 à 170 % de l'effet ionique sur la conductance sont observées (Zwieniecki et al., 2001; Cochard et al., 2010b; Nardini et al., 2011). En revanche, une étude montre une grande variabilité interspécifique de ce phénomène avec des effets inverses de la concentration ionique sur la conductance (Figure 33) (Cochard et al., 2010b). Ainsi, les espèces *Salix alba*, *Cedrus atlantica* et *Pinus sylvestris* montrent une diminution de la conductance après ajout de KCl. Les auteurs proposent alors que les membranes de *Salix alba* se comportent comme des structures de gel. Plus la teneur en eau du gel serait importante, plus sa perméabilité serait grande.

Le calcium semble avoir un effet inhibiteur sur le contrôle ionique de la conductance (Figure 33b). Le calcium forme des structures en boîte d'œuf avec les chaînes d'homogalacturonanes méthylées (Vincken et al., 2003) et pourrait ainsi stabiliser les charges ioniques des pectines. La capacité des pectines à former un hydrogel est dépendante de leur degré d'estérification. L'effet inhibiteur du calcium sur le contrôle ionique de la conductance est un argument supplémentaire pour la présence de pectines dans les ponctuations.

Si l'effet ionique de la sève a d'abord été attribué aux pectines, leur présence dans les membranes de ponctuations demeure en débat. Des plants de *Nicotiana tabaccum* modifiés pour l'expression d'une polygalacturonase ne montrent pas de changement dans l'effet ionique de la sève sur la conductance (Nardini et al., 2007). Ces plantes présentent moins d'homogalacturonanes désésterifiés que des plantes sauvages. L'absence d'impact de cette surexpression sur l'effet ionique semble aller à l'encontre du paradigme développé par Zwieniecki et al., 2001. Une hypothèse alternative a été proposée. Elle expliquerait l'effet ionique par tout polyélectrolyte présent dans les membranes de ponctuation incluant les hémicelluloses et les lignines (van Doorn et al., 2011). Les interactions de ces polyélectrolytes avec les ions et molécules d'eau de la sève ralentiraient le flux en périphérie des nano-pores des membranes.

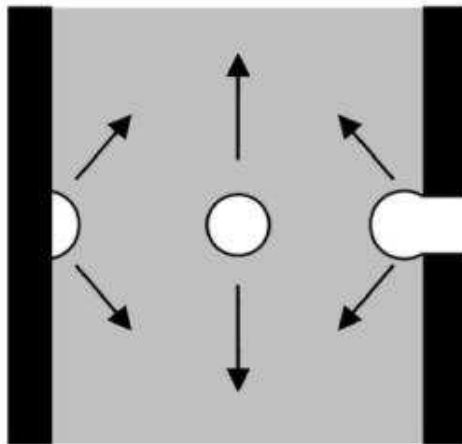


Figure 34 : Principales hypothèses sur l'origine de la cavitation dans les conduits du xylème. La perte de cohésion des molécules d'eau (nucléation homogène, au centre) s'oppose à la perte d'adhésion à la paroi du conduit d'une bulle ou encore à l'aspiration à travers un pore ou une micro-fracture de la paroi (nucléation hétérogène, gauche et droite respectivement). (Cochard, 2006)

V VULNERABILITE A LA CAVITATION ET SECURITE DU TRANSPORT DE L'EAU

Comme nous l'avons développé dans le 2^{ième} chapitre, lors d'une sécheresse les forces de tensions augmentent dans le xylème jusqu'à une valeur seuil de cavitation qui cause une embolie gazeuse du vaisseau. La perte d'intégrité hydraulique qui en résulte a des conséquences drastiques sur la survie des arbres.

1) Un paramètre clé de la résistance à la sécheresse

La résistance du xylème à l'embolie est généralement évaluée par une courbe de vulnérabilité décrivant la relation entre les tensions subies par le xylème et le pourcentage de perte de conductance (*PLC*, Figure 12). Dans le 2^{ième} chapitre, nous avons décrit les conséquences sur la survie de la perte d'intégrité hydraulique inhérentes à l'embolie du bois. Le phénomène de cavitation est à l'origine de l'embolie du xylème et le terme de vulnérabilité à la cavitation est communément employé. La vulnérabilité à la cavitation est donc un caractère essentiel de résistance à la sécheresse. Les espèces les plus résistantes sont associées aux milieux présentant les plus faibles précipitations (Figure 13) (Maherali et al., 2004; Choat et al., 2012). Cette corrélation est indépendante des relations phylogénétiques des espèces et suggère donc une convergence adaptative de ce caractère. A titre d'illustration, chez les angiospermes, des caractères de fortes résistances à la cavitation ont évolué indépendamment au moins 20 fois (Maherali et al., 2004). Les gymnospermes et les angiospermes aux structures de bois différentes présentent des résistances à la cavitation adaptées à leur milieu. De plus, la résistance à la cavitation des espèces présente une forte corrélation avec le potentiel minimum de la plante (Pockman and Sperry, 2000), ce qui suggère une forte valeur adaptative de ce caractère. En effet, le potentiel minimum représente sûrement une évaluation plus robuste des conditions hydriques que les précipitations annuelles. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que tous les événements de cavitation ne conduisent pas à la formation d'embolie.

2) Mécanismes de cavitation

Lors de sécheresses, le potentiel hydrique du xylème diminue (Tyree and Sperry, 1989; Brodribb and Cochard, 2009). En deçà d'une certaine valeur de pression, l'état liquide de la sève devient métastable et la cavitation a lieu. La cavitation est l'envahissement brutal des éléments conducteurs d'une phase gazeuse sous forme de bulles de vapeur d'eau et d'air qui chasse la phase liquide (Figure 34) (Tyree and Sperry, 1989; Cruziat et al., 2001). Ce changement brutal de phase peut être causé par nucléation homogène ou hétérogène. La nucléation homogène résulte d'une rupture de la cohésion des molécules d'eau. Elle ne semble pas être responsable de la cavitation dans le xylème des plantes car elle se produit à des pressions bien plus négatives (entre -30 et -140

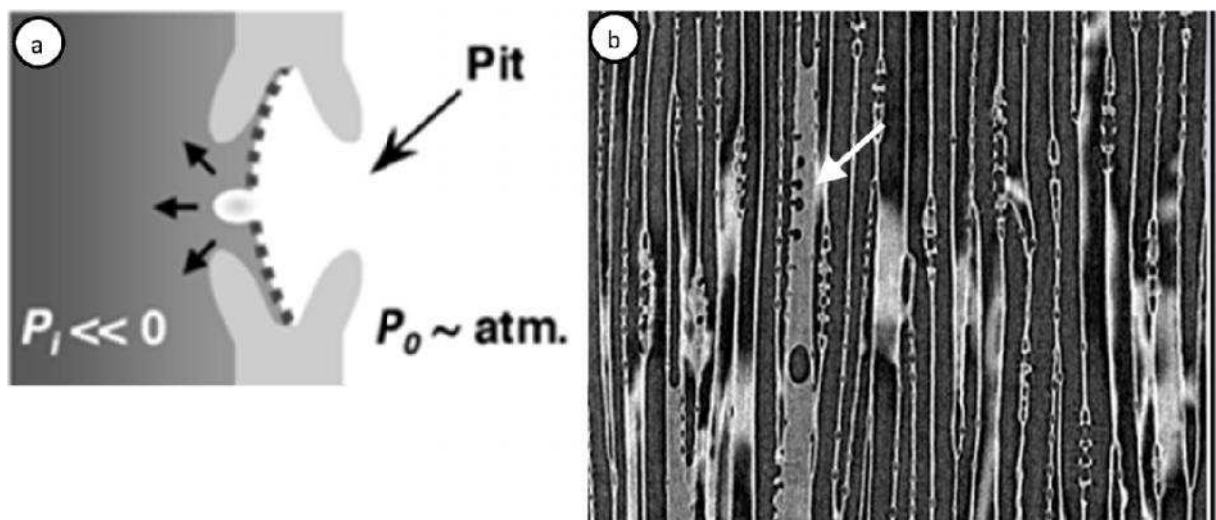


Figure 35 : Cavitation par germe d'air au niveau des ponctuations. Mécanisme du germe d'air (a). Lorsqu'une ponctuation connecte un vaisseau embolisé sous pression atmosphérique (1 atm) à un vaisseau fonctionnel sous pression négative, sa membrane est soumise à une différence de pression. Un ménisque air /eau se forme au niveau des pores de la membrane. Bois de *Pinus sylvestris* observé en nano-tomographie (b). Les trachéides embolisées sont remplies d'air et apparaissent noires alors que les trachéides fonctionnelles sont remplies d'eau et apparaissent grises. La trachéide indiquée par une flèche blanche est en train de subir la cavitation. L'air des trachéides adjacentes est aspiré au niveau des ponctuations. D'après (Hacke and Sperry, 2001) (a) et E. Badel, communication personnelle (b).

MPa) que les pressions physiologiques (> -10 MPa) (Tyree and Sperry, 1989; Tyree and Zimmermann, 2002). La nucléation hétérogène semble être une cause plausible de la cavitation (Cochard, 2006). La nucléation hétérogène est déclenchée au niveau de sites de nucléation tels que des petites bulles d'air présentes dans les conduits ou encore par l'aspiration de ces petites bulles au niveau de pores ou de micro-cassures au niveau de la paroi des conduits (Tyree and Sperry, 1989; Tyree et al., 1994; Cochard, 2006; Konrad and Roth-nebelsick, 2009).

Des preuves expérimentales tendent en faveur de l'aspiration de bulles au niveau de pores de la paroi (Cochard et al., 1992; Cochard, 2006). En effet ; il a été montré que l'injection d'air à l'extrémité d'un rameau pour une pression +P avait le même effet sur la conductance que de diminuer la pression du xylème à une valeur de -P (Cochard et al., 1992). Cela suggère que la cavitation est causée par la rupture d'un ménisque air/eau au niveau d'un pore. On parle du germe d'air (Cruziat et al., 2001). Une autre preuve expérimentale est que si on perfuse des segments de tiges avec des liquides de différente tension de surface, la pression nécessaire à induire de l'embolie change (Sperry and Tyree, 1988; Choat et al., 2008; Cochard et al., 2009). D'après la loi de Laplace si on augmente la tension de surface d'un liquide, la pression nécessaire à induire de l'embolie devient plus négative. Les ponctuations sont les candidats principaux de site de germe d'air car elles représentent des interruptions de la paroi secondaire et ont ainsi une porosité supérieure aux parois des conduits (Figure 35a). Des expériences de perfusion de liquide de différente surface de tension sur une paire de vaisseaux connectés par un champ de ponctuation conforte cette hypothèse (Choat et al., 2004). De plus, de nombreuses corrélations ont été mises en évidence entre des paramètres structuraux des ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation des espèces (Wheeler et al., 2005; Christman et al., 2009; Jansen et al., 2009; Lens et al., 2011; Christman et al., 2012). Des corrélations entre la vulnérabilité à la cavitation et la porosité des ponctuations ont notamment été observées (Jansen et al., 2009). Enfin, des observations en nano-tomographie du passage de bulle d'air à travers les ponctuations lors de déshydratation confortent cette hypothèse (Figure 35b, communication d'E. Badel).

Les pores de la ponctuation permettraient le passage de l'eau et limiteraient la propagation de bulles d'air. Lorsqu'une ponctuation connecte un vaisseau embolisé sous pression atmosphérique (1 atm) à un vaisseau fonctionnel sous pression négative, sa membrane est soumise à une différence de pression (Figure 35a). Un ménisque air /eau se forme au niveau des pores de la membrane. La rupture du ménisque se fait pour une certaine pression. Selon la loi de Laplace, la pression pour laquelle le germe d'air se produit est fonction du diamètre du pore considéré et de la tension de surface de l'interface gaz/liquide :

$$P_e = -\frac{4\pi \cos(a)}{D_p}$$

Avec P_e la pression d'entrée d'air dans le vaisseau fonctionnel, τ la tension de surface de l'eau (0.0728 N.m⁻¹ à 20 °C), α l'angle de contact (en degrés) entre la membrane et le ménisque (considéré comme égal à zéro) et D_p le diamètre du pore. Supposons que la tension de la sève soit de -0.5 MPa. Au niveau de la ponctuation des ménisques à l'interface eau/air se forment. Au fur et à mesure que la tension diminue (devient plus négative), passant par exemple de -0.5 MPa à -1 MPa, les ménisques se creusent de plus en plus. Lorsque la limite de résistance de ces ménisques, déterminée par le rayon du pore le plus large, est atteinte, une microbulle apparaît, enfle et envahit l'élément conducteur. Ainsi un pore de 300 nm devient perméable au passage de bulle d'air à partir d'une pression de -1 MPa. A l'échelle d'un vaisseau, la bulle d'air formée par germe d'air subit une expansion selon l'équation des gaz parfaits, sous l'action des tensions présentes dans le xylème. Ainsi, la cavitation conduit à l'embolie des éléments conducteurs du xylème, qui sont alors remplis d'air. Les vaisseaux deviennent non fonctionnels et à pression atmosphérique. L'embolie du système conducteur va ainsi impacter la conductance du xylème, et limiter la quantité d'eau apportée aux parties en aval du flux.

Des phénomènes d'embolie hivernale peuvent aussi se développer pendant des cycles de gel/dégel. Le mécanisme serait différent de celui de l'embolie estivale. Des bulles d'air se forment lorsque l'eau passe à l'état solide et restent insolubles lors de la fusion de l'eau. Ces bulles peuvent alors se propager. Tandis que la résistance à l'embolie estivale serait conditionnée par les propriétés des ponctuations, la résistance à l'embolie hivernale est en partie conditionnée par les dimensions des vaisseaux. Un plus grand vaisseaux est plus sensible à l'embolie hivernale (Davis et al., 1999).

3) Techniques de mesures de la vulnérabilité à la cavitation

Il est possible de détecter des événements de cavitation par méthode acoustique. Cette méthode mesure les émissions acoustiques produits par les tensions qui se libèrent lorsqu'un vaisseau cavite. Une autre méthode de cryo-MEB qui permet de comptabiliser le nombre de vaisseaux cavités. Ces méthodes ne permettent pas de mesurer l'impact sur la conductance du xylème. Les méthodes employées communément sont hydrauliques et mesurent la perte de conductance sous l'action des tensions présentes dans le xylème. (Sperry and Tyree, 1988; Cochard et al., 1992; Alder et al., 1997; Cochard, 2002a; Cochard et al., 2005; Cochard et al., 2013). Lorsqu'un élément conducteur s'embolise, il devient inapte au transfert de l'eau, il en résulte une perte de conductivité hydraulique du rameau (Cruziat et al., 2001). La conductance est mesurée à partir d'un débitmètre ou d'une balance de précision. La tension est appliquée au xylème par déshydratation, ou centrifugation. Une différence de pression peut aussi être appliquée par pressurisation. La méthode communément employée au laboratoire PIAF est le Cavitron. Le Cavitron permet de mesurer la conductance d'un segment de tige tout en appliquant une tension par centrifugation

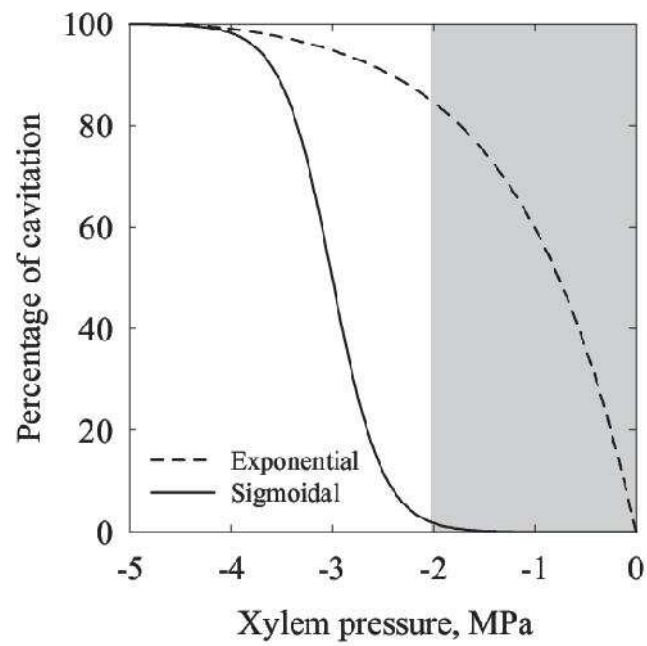


Figure 36 : Représentation schématique de courbes de vulnérabilité sigmoïdale (trait plein) et exponentielle (tiret). La courbe sigmoïdale présente une gamme de pression pour laquelle les taux de cavitation sont bas (zone grise) alors que la courbe exponentielle n'en présente pas. (Cochard et al., 2013)

(Cochard, 2002a; Cochard et al., 2005).

La littérature sur les courbes de vulnérabilité à la cavitation montre deux grands types de courbes de vulnérabilité à la cavitation. Les courbes sigmoïdales présentent une faible augmentation des taux d'embolie jusqu'à une valeur seuil de pression pour laquelle les taux d'embolie augmentent brusquement. Elles s'opposent aux courbes exponentielles qui présentent une augmentation de taux d'embolie dès l'application d'une pression faible (figure 36). Ces courbes exponentielles sont celles des espèces à longs vaisseaux, incluant les espèces aux bois à zones poreuses. La légitimité des courbes exponentielles est débattue et relèverait de problèmes de méthodologie (Cochard et al., 2010a; Sperry et al., 2012; Cochard et al., 2013). Les courbes exponentielles seraient générées par un artefact lié au ratio entre la longueur de l'échantillon et celle de ses vaisseaux ; les longs vaisseaux ouverts seraient artificiellement rendus vulnérables. Ces courbes surestiment donc la vulnérabilité à la cavitation de l'échantillon considéré (Cochard et al., 2010a).

4) Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation

La vulnérabilité à la cavitation varie considérablement, et à différents niveaux de comparaison: entre espèces ou au sein d'une même espèce. Ces variations peuvent être d'origine génétique, ou liées à une plasticité phénotypique, selon l'organe, la phénologie ou les conditions environnementales.

Les espèces sont classiquement comparées pour leur vulnérabilité à la cavitation par un paramètre quantitatif : le P_{50} . Le P_{50} présente une grande variabilité interspécifique (Figure 12). Chez les angiospermes, on observe des variations de P_{50} , de -11 MPa à -0.8 MPa chez *Ceanothus megacarpus* et *Populus trichocarpa* respectivement. Chez les gymnospermes, on observe des variations de P_{50} de -14 MPa à -2 MPa chez *Juniperus chilensis* et *Austrocedrus chilensis* respectivement (Choat et al., 2012). Dans les espèces forestières de France, on retrouve des espèces vulnérables telles que les peupliers ($P_{50} = -1.5$ MPa) et les saules ($P_{50} = -1.5$ MPa) (Cochard et al., 1992). Parmi les espèces moins vulnérables, on trouve des chênes méditerranéens ($P_{50} = 5.7$ MPa) (Tyree et al., 1994) ou des cèdres ($P_{50} = 4.5-5$ MPa) (Cochard, 1992). Récemment, une méta-analyse sur 480 espèces rend compte de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation et de son importance pour la résistance à la sécheresse (Choat et al., 2012). Quelques plantes herbacées ont été caractérisées pour la vulnérabilité à la cavitation telle que *Phaseolus vulgaris* ($P_{50} = -0.468$ à -0.999 MPa) (Mencuccini and Comstock, 1999) et *Chamerion angustifolium* ($P_{50} = -1.59$ MPa, -1.66 MPa, respectivement diploïde et tetraploïde) (Maherali et al., 2009). Des valeurs de P_{50} pour des espèces monocotylédones ont aussi été déterminées chez *Zea mays* (Cochard, 2002b; Li et al., 2009), *Oryza sativa* (Stiller et al., 2003), et *Chusquea ramosissima* (Saha et al., 2009). Enfin, la caractérisation d'un

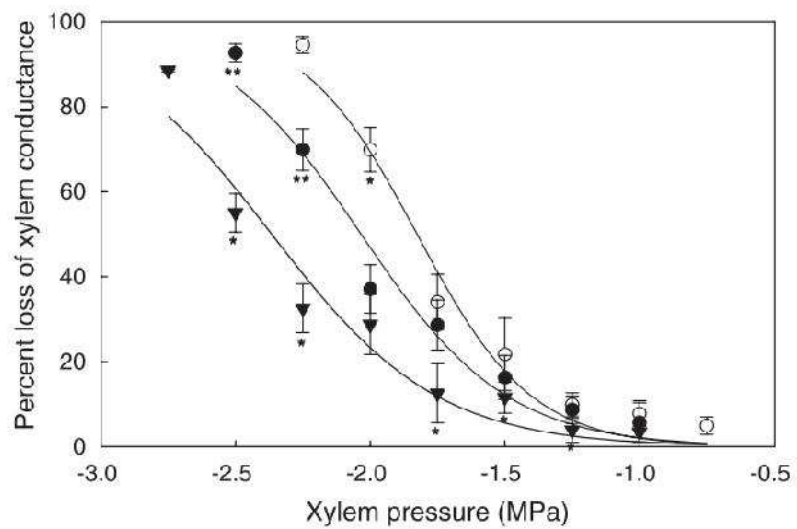


Figure 37 : Variabilité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez *Populus tremula x alba*. Courbe de vulnérabilité à la cavitation de peupliers soumis à différents régimes hydriques. Rond blanc : plants témoins, rond noir : plants soumis à un stress modéré, triangle noir : plants soumis à un stress sévère. Les valeurs de PLC significativement différentes entre traitements pour une pression donnée présentent des symboles différents (*, **). (Awad et al., 2010).

nombre d'espèces provenant d'habitats très contrastés a permis de mettre en évidence que la résistance à la cavitation peut expliquer la distribution et la résilience face à la sécheresse des espèces (Maherali et al., 2009; Delzon et al., 2010; Choat et al., 2012).

L'analyse de variabilité intraspécifique de la vulnérabilité à la cavitation demeure moins exhaustive que celle de la variabilité interspécifique. En général, la gamme de variabilité observée pour la vulnérabilité à la cavitation en intraspécifique est plus faible (généralement inférieur à 2 MPa) que celle observée en interspécifique. La comparaison de la variabilité génotypique et de plasticité phénotypique en intraspécifique a mis en exergue l'importante plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation. En effet, des études menées sur des populations naturelles de *Pinus pinaster* et *Fagus sylvatica* montrent une grande plasticité phénotypique et une faible différenciation génétique entre populations (Lamy et al., 2011; Wortemann et al., 2011).

La vulnérabilité à la cavitation présente une plasticité phénotypique en répondant notamment au régime hydrique du sol, à la lumière et à la disponibilité en nutriment (Stiller and Sperry, 2002; Awad et al., 2010; Herbette et al., 2010; Plavcová et al., 2011). Awad et al. (2010) ont montré une variabilité de P_{50} en réponse à différents régimes hydriques chez *Populus tremula x alba*. Les plants soumis à un régime hydrique plus contraignant présentent une vulnérabilité à la cavitation plus faible (P_{50} -2.45 MPa) que les plantes témoins (P_{50} = -1.82 MPa) (Figure 37, Awad et al., 2010). Ainsi, les propriétés structurales intrinsèques à la vulnérabilité à cavitation s'acclimatent aux conditions du milieu. La plante peut mettre en place de nouveaux éléments conducteurs via l'activité cambiale. Ces éléments seront potentiellement adaptés aux pressions expérimentés par le xylème.

Une réponse phénotypique similaire à des variations d'arrosage a été observée chez *Helianthus annuus* avec des variations de P_{50} de -1.7 à -3.3 MPa (Stiller and Sperry, 2002). La lumière a aussi un effet sur la vulnérabilité à la cavitation (Cocharde et al., 1999; Barigah et al., 2006; Herbette et al., 2010; Plavcová et al., 2011). Les branches développées sous pleine lumière sont moins vulnérables à la cavitation que les branches d'ombre. Cette différence liée à l'exposition peut s'expliquer du fait que des valeurs d'irradiance plus fortes s'accompagnent généralement d'une demande évaporative plus forte, et donc de tensions plus fortes au sein du xylème; la mise en place d'un xylème moins vulnérable est donc nécessaire afin de pallier les risques éventuels d'embolie.

La vulnérabilité à la cavitation peut varier au sein d'un même individu en fonction des organes considérés: pétiole, tige ou racine. A titre d'exemple, les racines sont généralement plus vulnérables que les tiges (Alder et al., 1997), probablement car le potentiel hydrique des racines est plus élevé.

5) *Résorption de l'embolie et fatigue de la cavitation*

Des phénomènes de réparation de l'embolie ont été observés chez certaines espèces. Ainsi, chez *Fraxinus americana* et *Acer rubrum* des variations journalières de taux d'embolie ont été observées (Zwieniecki and Holbrook, 2001). Les taux d'embolies mesurés à l'aube sont inférieurs aux taux d'embolie mesurés dans le milieu de journée précédente. Le phénomène est observé chez d'autres espèces comme *Laurus nobilis* et *Vitis vinifera* (Salleo et al., 2000; Holbrook et al., 2001). Ces phénomènes de réparation de l'embolie sont même observés *in vivo* en imagerie par résonance magnétique (Holbrook et al., 2001; Brodersen et al., 2010). La réparation de l'embolie estivale se ferait grâce à des exports localisés de solutés dans le vaisseau embolisé à partir des cellules du parenchyme xylemien. Cela générerait une pression osmotique dans ces vaisseaux. Cette hypothèse implique l'isolement du vaisseau, en cours de remplissage, du reste du réseau hydraulique sous tension (Hacke and Sperry, 2001; Zwieniecki and Holbrook, 2009). En effet, une augmentation de la pression de la sève est indispensable pour permettre la dissolution des bulles (Ewers et al., 2001). Or, en été, le système vasculaire de la plante est sous tension. Une telle augmentation de pression n'est donc possible qu'en l'absence des feuilles, dont l'évaporation tire la sève par le haut, ou par l'isolement du vaisseau embolisé. Des phénomènes de réparation de l'embolie hivernale ont d'ailleurs été observés chez des arbres décidus (Améglio et al., 2002). En revanche, aucune hypothèse ne peut expliquer comment les plantes peuvent isoler, et remplir les vaisseaux embolisés, puis les reconnecter au réseau sous tension, pour réaliser la résorption de l'embolie estivale. De récentes études montrent que ces observations de réparation de l'embolie seraient inhérentes à des artefacts d'échantillonnage (Sperry, 2013). Le laboratoire de Michele Holbrook, celui qui avait publié les travaux sur la résorption de l'embolie, a récemment publié une autre étude démontrant qu'il s'agissait d'artefacts de méthodes (Wheeler et al., 2013). Ces artefacts seraient générés au moment où l'échantillon est sectionné. De l'air entrerait dans les vaisseaux au moment de la coupure.

Si les hypothèses de réparation de l'embolie estivale tendent à être réfutées, il a été montré expérimentalement sur des segments de tige que les vaisseaux re-remplis seraient toutefois moins résistants à la cavitation. On parle de fatigue de cavitation (Hacke et al., 2001c; Stiller and Sperry, 2002). La fatigue de la cavitation n'est pas causée par des bulles résiduelles dans les vaisseaux mais par une augmentation de la sensibilité au germe d'air. Ces résultats soulignent l'importance du germe d'air dans la cavitation et supportent le rôle des ponctuations dans la vulnérabilité à la cavitation.

L'importance de l'intégrité hydraulique, ajouté au fait que la résorption de l'embolie soit peu probable souligne l'importance de la vulnérabilité à la cavitation pour la résistance à la sécheresse.

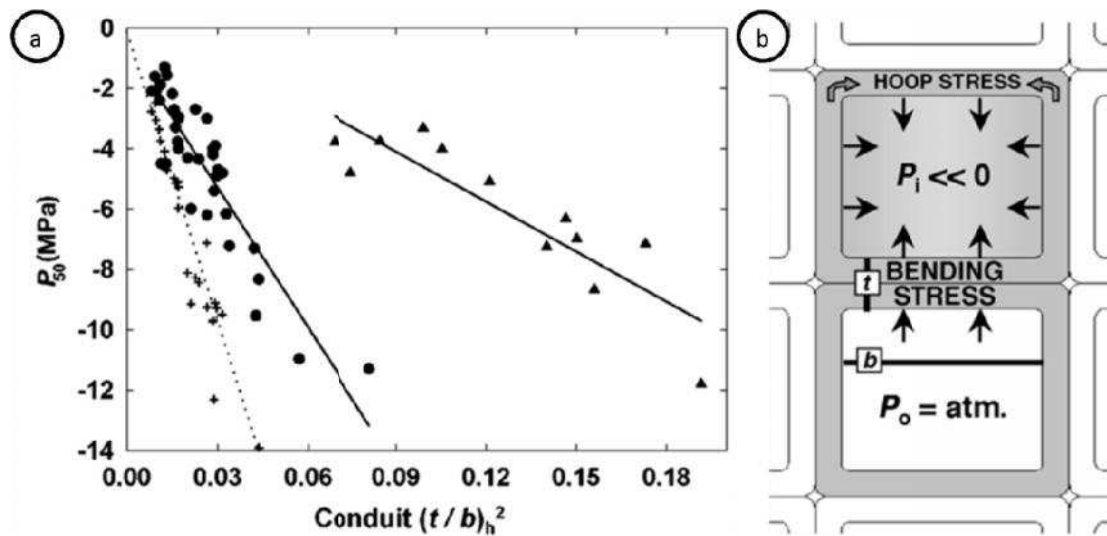


Figure 38 : Relation entre les résistances mécaniques et à la cavitation des vaisseaux. Relation entre P_{50} et $(t/b)^2$ (ratio entre épaisseur de paroi des vaisseaux (t) et leur diamètre (b)) chez plusieurs espèces ligneuses angiospermes (rond) et gymnospermes (triangles), (a). Les croix et la ligne en pointillée représente la limite d'implosion estimée chez les angiospermes et les gymnospermes. Les valeurs au dessus de cette ligne présente une sécurité à l'implosion. Schéma représentant l'importance des dimensions t et b pour la résistance à l'implosion (b) (Hacke et al., 2001b).

6) *Compromis entre résistance à la cavitation et les propriétés du bois*

Toutes les espèces ne développent pas une résistance importante à la cavitation. La mise en place d'un bois résistant à la cavitation pose probablement des contraintes. Les espèces résistantes à l'embolie sont caractérisées par une forte densité du bois. L'augmentation de la densité du bois implique des coûts énergétiques importants qui sont utilisés au détriment de la croissance de la plante (Hacke et al., 2001b). Au niveau tissulaire, la densité du bois est liée à sa porosité, c'est-à-dire le ratio entre la surface occupée par les parois des cellules sur la surface totale (Hacke et al., 2001b).

Des relations positives entre résistance mécanique et résistance à la cavitation ont aussi été proposées. Une forte résistance mécanique conférerait une plus grande résistance à l'implosion chez les espèces soumises à des fortes tensions dans les milieux secs. A l'échelle cellulaire, le ratio de l'épaisseur de la paroi des vaisseaux (t) sur le diamètre de leur lumière (b) est corrélé avec la vulnérabilité à la cavitation interspécifique (Figure 38, (Hacke et al., 2001a). Les rapports de t/b plus élevés chez les espèces résistantes à l'embolie sont souvent expliqués par les tensions plus négatives qu'elles subissent et traduirait une plus grande résistance à l'implosion (Hacke et al., 2001a). Pourtant, aucun collapse à ce jour n'a encore été observé dans le bois des espèces ligneuses en condition naturelles. En revanche, des collapses ont été observés dans des aiguilles de conifères (Cochard et al., 2004), chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Turner and Somerville, 1997) ou encore dans des lignées transgéniques de peupliers sous-exprimant des lignines (Voelker et al., 2011). Ceci n'exclue pas que les parois soient renforcées pour éviter l'implosion ; ainsi la cavitation surviendrait avant que les tensions n'aboutissent au collapse du vaisseau. Le renforcement mécanique des conduits traduit par le rapport t/b pourrait empêcher la formation de micro-fractures plutôt que de collapses (Jacobsen et al., 2005). Ces micro-fractures pourraient générer des sites de nucléation hétérogènes à la cavitation. Toutefois, de telles micro-fractures n'ont encore été mises en évidence.

Les fibres de la matrice qui entoure les vaisseaux semblent jouer un rôle prépondérant dans la résistance à l'implosion (Hacke and Sperry, 2001; Jacobsen et al., 2005; Awad et al., 2012). La résistance mécanique ainsi que la résistance à l'implosion seraient dépendants des propriétés du tissu. Les vaisseaux ne peuvent être appréhendés comme des éléments isolés alors que ces cellules sont incluses et entourées d'une matrice de fibres, des cellules spécialisées dans la résistance mécaniques. Les corrélations entre le ratio t/b et la vulnérabilité à la cavitation pourraient être indirectes et associées à des variations de ce ratio non pas au niveau des vaisseaux mais aux niveaux des fibres. Ceci expliquerait donc la corrélation entre densité du bois et résistance à la cavitation, évoquée ci-avant.

Des études sur plantes transgéniques tendent à remettre en cause la relation entre vulnérabilité à la cavitation et résistance mécanique. Une étude sur des lignées transgéniques de

peupliers montre des diminutions de vulnérabilité à la cavitation sans toutefois affecter les propriétés mécaniques des tiges (Awad et al., 2012). Ces observations suggèrent que la vulnérabilité à la cavitation et la résistance mécanique sont partiellement découplées. Les paramètres de résistances à la cavitation et de résistance mécanique sont souvent jugés positivement corrélés (Pratt et al., 2007) probablement car ces deux fonctions dépendent partiellement de la densité du bois. De plus, les études de compromis entre les fonctions de résistances à la cavitation et résistance mécanique sont souvent menées chez les gymnospermes. Or, chez les gymnospermes, les trachéides assurent conjointement les fonctions de résistance mécanique et de conduction. Les relations de compromis à l'échelle cellulaire sont probablement plus importantes que chez les angiospermes qui présentent des bois hétéroxylés.

7) Les ponctuations : structures clés de la vulnérabilité à la cavitation

De nombreuses études pointent les ponctuations comme les structures primordiales de la résistance à la cavitation. La cavitation semble survenir par l'aspiration d'une bulle d'air à travers la membrane de la ponctuation (Zimmermann, 1983; Choat et al., 2004; Cochard, 2006; Jansen et al., 2011). Pour comprendre le rôle des ponctuations dans la vulnérabilité à la cavitation, il faut considérer les aspects liés à leur quantité mais aussi ceux liés à leur qualité de part leurs structures et compositions. Les gymnospermes et angiospermes ont des ponctuations aux structures et aux comportements très différents. Il est donc fort probable que les propriétés déterminantes dans la vulnérabilité à la cavitation ne soient pas les mêmes entre ces deux types de ponctuations (Choat and Pittermann, 2009). Nous aborderons donc les aspects qualitatifs dans deux parties distinctes (b et c).

a. Implication du nombre de ponctuations

D'après la loi de Laplace, la porosité de la membrane joue un rôle crucial dans la pression du germe d'air. De plus, la théorie de la ponctuation rare suggère que la probabilité d'embolie d'un vaisseau augmente de manière stochastique avec le nombre de ponctuations ou leur aire totale sur ces parois. La ponctuation du vaisseau à l'origine de l'embolie serait celle présentant le plus grand pore (Christman et al., 2009). Ainsi, la distribution de la taille des pores augmente avec le nombre de ponctuation. Des corrélations entre la vulnérabilité à la cavitation et l'aire de ponctuation sont observées chez certains groupes d'angiospermes alors que d'autres groupes montrent des corrélations avec le nombre de ponctuations (Hacke et al., 2006; Christman et al., 2009; Lens et al., 2011).

Calculer le nombre ou l'aire de ponctuations par vaisseau présente des difficultés techniques car le xylème présente une structure en trois dimensions. Or, analyser une ponctuation de quelques

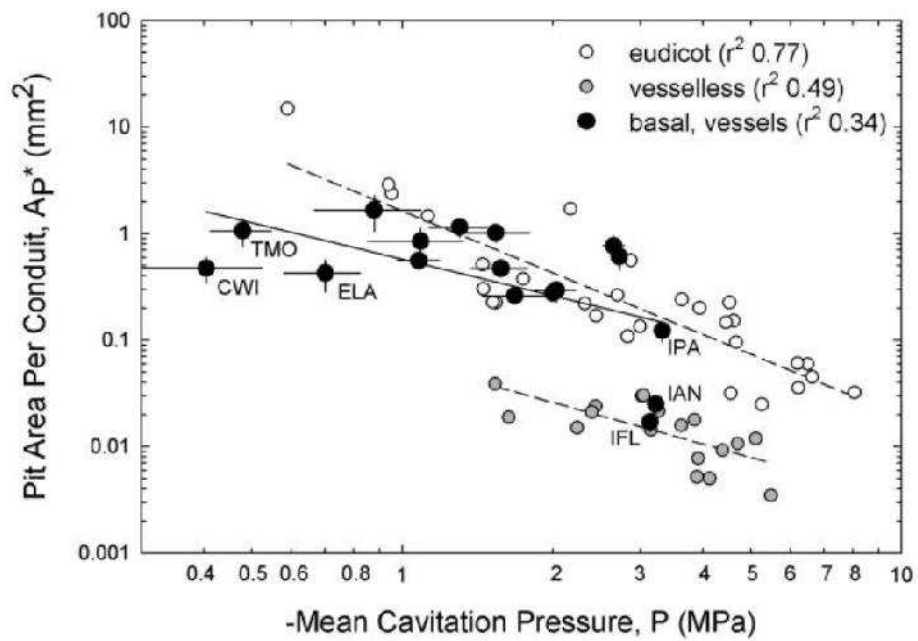


Figure 39 : Relation entre la surface occupée par des ponctuations pour un vaisseau (A_p) et la pression induisant la cavitation chez des espèces d'angiospermes. Si la corrélation semble forte entre les eudicot, la relation semble moins importante chez les espèces angiospermes basales. CWI : *Canella winterana*, TMO : *Trimenia moorei*, ELA : *Eupomatia laurina*, IPA *Illicium parviflorum*, IAN *Illicium anisatum*, IFL *Illicium floridanum*. (Sperry et al., 2007)

microns de diamètre implique l'utilisation de techniques de microscopie ne permettant des observations que selon un plan. Des méthodes d'estimation de la surface occupée par des ponctuations pour un vaisseau (« pit area », A_p) ont donc été développées (Wheeler et al., 2005; Jansen et al., 2009). Ces méthodes se basent sur l'hypothèse que le nombre de ponctuations dépend de la connectivité des vaisseaux. Ainsi, plus les vaisseaux seraient groupés, plus des champs de ponctuations les connectant seraient nombreux. Pour estimer la connectivité des vaisseaux sur coupe transversale, on calcule le rapport entre la longueur de paroi connectant des vaisseaux avec le périmètre total des vaisseaux (« intervessel contact fraction », F_C). Ensuite, la surface occupée par les ponctuations de ces parois connectant les vaisseaux (« Intervessel pit-field fraction », F_{PF}) peut être évaluée en MEB sur des coupes longitudinales de vaisseaux. La surface moyenne de vaisseaux, calculée d'après leur diamètre (D) et leur longueur (L), permet alors d'estimer la surface moyenne occupée par des ponctuations selon l'équation :

$$A_p = \pi \times D \times L \times F_C \times F_{PF}$$

avec D et L le diamètre et la longueur moyenne des vaisseaux. Des corrélations entre A_p et le P_{50} sont trouvés dans la famille des *Rosaceae* (Wheeler et al., 2005) et chez des espèces présentant des plus grandes variabilités phylogénétiques et structurales de bois (Figure 39) (Hacke et al., 2006; Sperry et al., 2007).

La relation entre la quantité de ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation ne s'applique pourtant pas dans tous les groupes phylogénétiques ; ce caractère ne semble donc pas déterminant dans la vulnérabilité à la cavitation. En effet, cette relation n'existe pas dans le genre *Acer* (Lens et al., 2011). En revanche, les auteurs déterminent de fortes corrélations entre les dimensions et propriétés structurales des ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation. Ces propriétés définiraient la qualité intrinsèque des ponctuations.

b. Aspects qualitatifs des ponctuations chez les gymnospermes

Chez les gymnospermes, la ponctuation présente un fonctionnement similaire à une valve. En 2006, Cochard propose différentes hypothèses pour le mécanisme de cavitation à travers les ponctuations des gymnospermes (Figure 40). La première serait de considérer qu'il n'y a pas de déplacement de la membrane et que l'air germe à travers un pore du margo (Figure 40a) (Cochard, 2006; Delzon et al., 2010). Cependant, les pores du margo semblent trop grands pour correspondre à la pression induisant de la cavitation selon la loi de Laplace. De plus, la pression nécessaire à plaquer la membrane contre les bordures de la ponctuation semble supérieure à la pression de cavitation à travers un pore du margo (Domec et al., 2006). Les autres hypothèses de nucléations considèrent le déplacement du torus qui agirait ainsi comme une valve au niveau de l'ouverture de la ponctuation

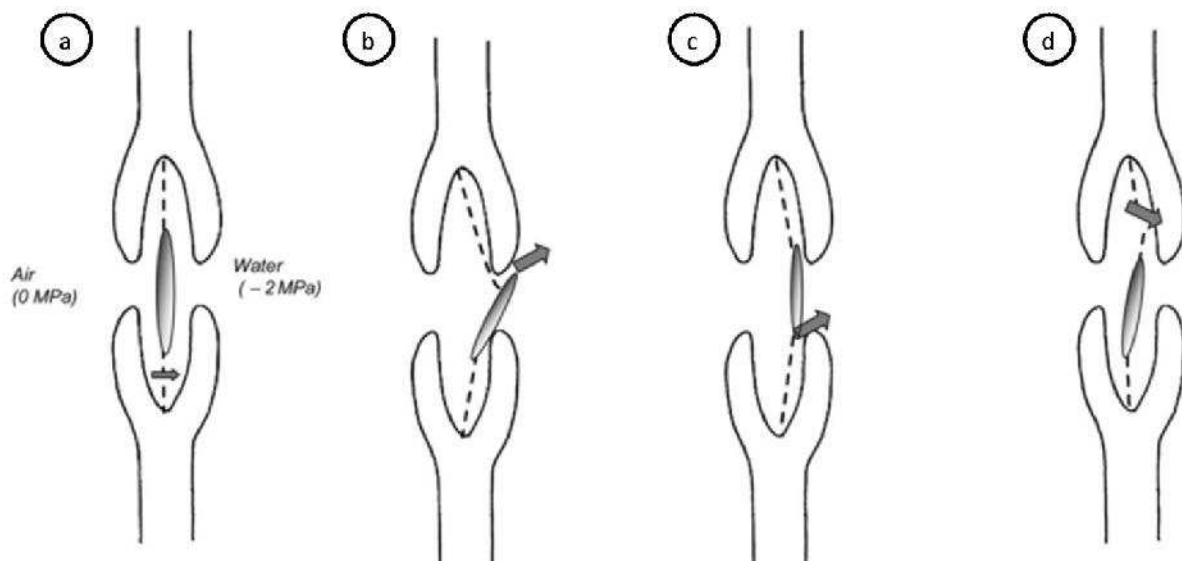


Figure 40 : Les différentes hypothèses de germe d'air à travers une ponctuation de gymnosperme. L'air peut germer à travers un pore du margo (a). L'air peut germer en raison d'un étirement excessif du margo qui empêcherait au torus de sceller l'ouverture de la ponctuation (b). L'air peut germer sur le bord du torus que ne scelle pas parfaitement l'ouverture de la ponctuation (c). Le germe d'air peut avoir lieu en raison d'une cassure du margo (d). (Delzon et al., 2010)

(Figure 40b, c, d). Cette hypothèse de déplacement s'appuie sur le fait que la conductance diminue lorsque l'on perfuse un segment de tige de gymnosperme sous haute pression (Cochard et al., 2009). En outre, plus la proportion de surface de membrane que représente le margo est élevée, plus l'espèce est résistante à la cavitation (Delzon et al., 2010). Lorsqu'une trachéide est embolisée, les membranes de ses ponctuations sont soumises à une différence de pression, le margo s'étire alors pour plaquer le torus contre l'aperture du côté des trachéides fonctionnelles (sous tension, figure 40c). Le torus étant imperméable, il isolerait alors les trachéides embolisées en scellant l'ouverture de la ponctuation.

Les fortes tensions pourraient casser (Figure 40d) ou étirer le margo au point d'empêcher l'action de valve du torus (Figure 40b et c). Le torus pourrait alors glisser à travers l'ouverture de la ponctuation (Figure 40b). Les hypothèses de cassure du margo et de glissement du torus à travers l'ouverture de la ponctuation semblent peu probables car elles conduiraient à une augmentation de conductance dans les expériences de perfusion à haute pression, ce qui n'est pas le cas (Cochard et al., 2009). Ensuite, le glissement du torus à travers l'ouverture de la ponctuation impliquerait que la surface de margo augmente avec la vulnérabilité à la cavitation ; alors que la relation inverse a été observée (Delzon et al., 2010). L'hypothèse la plus plausible serait que l'air germe sur le bord du torus qui ne scelle pas parfaitement l'ouverture de la ponctuation ou encore au niveau de pores sur le torus (Cochard, 2006; Jansen et al., 2012). Delzon et al., (2010) montrent une forte corrélation entre l'index de recouvrement du torus et la vulnérabilité à la cavitation sur 40 espèces. Le recouvrement du torus est le ratio entre la surface du torus et celle de l'aperture.

L'intégration des variables morphologiques des ponctuations pour définir ces index de recouvrement montrent des corrélations plus fortes avec le P_{50} que les variables morphologiques seules. Il est donc important d'avoir ces approches fonctionnelles et intégratives pour relier la géométrie de la ponctuation à la vulnérabilité à la cavitation.

c. Aspects qualitatifs des ponctuations chez les angiospermes

Des études récentes ont souligné l'importance de la structure des ponctuations homogènes d'angiospermes dans la vulnérabilité à la cavitation. Des variations intraspécifiques et interspécifiques de la porosité des ponctuations ont été observées (Choat et al., 2003; Sano, 2005; Jansen et al., 2009). Cette porosité est corrélée à la vulnérabilité à la cavitation des espèces (Sano, 2005; Jansen et al., 2009). L'épaisseur de membrane est aussi corrélée avec la vulnérabilité à la cavitation. Ainsi, l'épaisseur de membrane est corrélée à la porosité (Sperry and Hacke, 2004; Hacke and Jansen, 2009). Cependant, la porosité demeure largement inférieure au pore calculé par l'équation de Laplace pour induire de la cavitation (Figure 41, (Choat and Pittermann, 2009; Jansen et al., 2009).

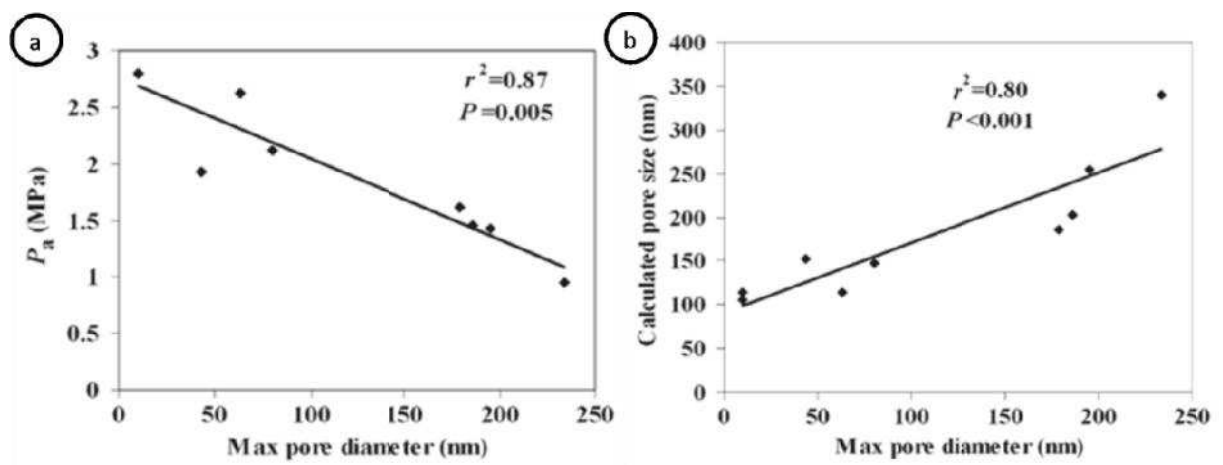


Figure 41 : Relation entre la porosité de la membrane de la ponctuation et la pression induisant la cavitation chez différentes espèces. Relation entre la pression de cavitation (P_a) et le diamètre maximum de pore mesuré par MEB (a). Relation entre le diamètre théorique du pore nécessaire à induire de la cavitation selon la loi de Laplace et le diamètre maximum de pore mesuré par MEB (b). D'après (Jansen et al., 2009)

Un tel écart entre les pores calculés et mesurés peut être expliqué par la méthode de mesure. Les méthodes microscopiques peuvent montrer des limites pour mesurer la taille des pores (Jansen et al., 2009). D'une part, il est peu probable de trouver le pore le plus grand de toutes les ponctuations d'un vaisseau, celui responsable de la cavitation. D'autre part, lors de leur observation, les membranes sont dans un état relâché car elles ne sont pas soumises à une différence de pression. Les pores de la membrane sont probablement agrandis ou encore créés par des micro-fractures lors de la cavitation (Tyree and Zimmermann, 2002; Choat et al., 2004; Sperry and Hacke, 2004). L'hypothèse prévalente est que la membrane de ponctuation soumise à une différence de pression se déplace pour se plaquer contre les bordures de la chambre de la ponctuation (Thomas, 1972; Hacke and Sperry, 2001; Sperry and Hacke, 2004). Ce déplacement implique une déformation à l'origine d'une augmentation de la porosité par rupture ou agrandissement des pores existants (Sperry and Hacke, 2004). Cette hypothèse est appuyée par des expériences de perfusion de particules colloïdales d'or à travers des champs de ponctuations (Choat et al., 2004). Lorsque la pression de perfusion augmente, elle permet le passage de particules plus grandes à travers le champ de ponctuation. Puis, lorsque la pression décroît, ces mêmes particules perdent la capacité à traverser le champ. Cette étude suggère que la ponctuation est déformée par une différence de pression et que cette déformation peut être réversible. Cette même étude a mis en évidence le rôle des ornements de la ponctuation pour limiter la déflexion et donc la déformation de la membrane (Zweypfenning, 1978). Les ornements des ponctuations ont d'ailleurs été associés à des espèces xérophiiles (Jansen et al., 2004a).

D'après ces résultats, le comportement mécanique de la ponctuation serait un paramètre clé de la résistance à la cavitation. La déformation de la membrane serait fonction : i) des caractéristiques géométriques de la membrane et de la chambre et ii) des propriétés mécaniques intrinsèques de la membrane, liées à sa composition. En accord avec l'hypothèse i), des corrélations entre le P_{50} et des dimensions de ponctuations ont été mises en évidence, notamment entre la profondeur de chambre, l'épaisseur de membrane, le diamètre de la chambre et le P_{50} (Lens et al., 2011). Ces variables conditionneraient le comportement mécanique des ponctuations et ainsi leur vulnérabilité au germe d'air. Cependant, il reste à élucider comment ces dimensions sont intégrées dans la structure de la ponctuation en lien avec sa fonction.

Si les ponctuations semblent être des structures destinées à limiter la propagation de l'embolie, elles assurent néanmoins le passage de la sève. Leur structure représente donc un compromis entre leurs fonctions d'efficacité hydraulique et de sécurité de transport de la sève. Ainsi, un diamètre important des pores facilite le passage de la sève mais avec un risque accru de cavitation (Sperry and Hacke, 2004).

VI OBJECTIFS DE THESE

A l'issu de cette synthèse bibliographique, il en ressort que la vulnérabilité à la cavitation est un caractère important pour la tolérance à la sécheresse, alors que les bases moléculaires et génétiques de la vulnérabilité à la cavitation demeurent largement méconnues. La connaissance des bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation serait utile pour prévoir le comportement des populations naturelles et pour orienter les choix de culture dans un contexte de changement climatique. De nombreuses études pointent les ponctuations comme des structures primordiales pour la résistance à la cavitation. Cependant, les propriétés physico-chimiques des ponctuations à l'origine de la résistance à la cavitation demeurent peu connues. Si l'on considère le germe d'air comme l'origine la plus probable de cavitation, la résistance à la cavitation n'est pas seulement dépendante de sa porosité mais aussi de la résistance mécanique de la membrane de la ponctuation soumise à une différence de pression (Choat et al., 2003). Si des corrélations entre les dimensions des ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation ont été mises en évidence, une explication fonctionnelle de ces corrélations est nécessaire pour comprendre l'importance de la géométrie des ponctuations dans la vulnérabilité à la cavitation. La composition des ponctuations peut aussi influencer de différentes façons leurs propriétés fonctionnelles. Elle conditionne ses propriétés mécaniques telles que le Module d'Young et sa compressibilité. Elle conditionne aussi l'interface air/eau sur le germe d'air ainsi que l'efficacité de transport. Les membranes des ponctuations sont définies comme des parois primaires modifiées (Schmid and Machado, 1968). En début de ce projet de thèse, il y avait des arguments en faveur de la présence de pectines dans les membranes de la ponctuation. Les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation pourraient être liées à la composition des membranes de ponctuations et à l'organisation de ses composants.

Le peu de connaissances sur la qualité des ponctuations est lié aux difficultés méthodologiques de leur étude. Les ponctuations sont des structures de quelques micromètres très localisées dans le tissu. Les vaisseaux sont connectés par des champs de ponctuations, et aucune étude n'a encore développée de technique permettant d'isoler hydrauliquement une ponctuation pour déterminer ses propriétés physiques. De plus, leur taille implique leur observation par des approches de microscopie électronique. Ces approches nécessitent une préparation des échantillons qui peut altérer les structures et empêche l'observation des ponctuations dans un état natif hydraté. Enfin, la composition des ponctuations demeure méconnue en raison du développement trop récent de techniques d'immuno-marquages sur les épitopes des polysaccharides pariétaux.

L'étude des déterminants génétiques de la vulnérabilité à la cavitation présente aussi des contraintes méthodologiques. Ceci expliquerait le manque d'études sur les bases génétiques malgré l'importance du caractère. En effet, les ponctuations représentent un petit territoire de l'apoplasme

dans un tissu majoritairement constitué de cellules mortes. De ce fait, les approches de transcriptomiques ont une portée limitée pour ces structures. En effet les variations d'expression de gène dans le xylème sont souvent inhérentes aux cellules du parenchyme et masquent probablement les expressions de gène liées aux ponctuations. A titre d'exemple, une étude d'expression de gènes de biosynthèse et de modification de la paroi chez le peuplier montre des variations d'expression semblables dans le bois et l'écorce en réponse à un stress hydrique (Awad, 2011). Une autre difficulté réside dans l'étude des gènes de parois. D'une part, la paroi présente un rôle constitutif au niveau des cellules d'une plante et il est donc difficile d'isoler des gènes spécifiquement impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation. D'autre part, les gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi sont très nombreux et pourraient potentiellement être tous candidats. A titre d'illustration, 10 % des gènes chez *Arabidopsis thaliana* seraient impliqués dans le métabolisme de la paroi. Ces gènes appartiennent généralement à des familles multigéniques (Mellerowicz et al., 2001; Farrokhi et al., 2006; Mellerowicz and Sundberg, 2008; Caffall and Mohnen, 2009).

Ce travail de thèse s'inscrit intégralement dans un projet ANR dont l'objectif est de comprendre le rôle des ponctuations dans la vulnérabilité à la cavitation. Le projet Pitbulle s'inscrit autour de trois questions principales :

- Quel est le fonctionnement d'une ponctuation et comment l'air traverse la membrane de la ponctuation ?
- Quelles sont les bases moléculaires et génétiques de la vulnérabilité à la cavitation ?
- Quelles structures et composition chimique des ponctuations expliquent les différences de vulnérabilité à la cavitation entre génotypes et phénotypes ?

Des collaborations fédérant différentes compétences disciplinaires ont été développées afin de répondre à ses questions. Ainsi, ce projet regroupe l'**UMR PIAF** (Physique et Physiologie de l'Arbre Fruitier et Forestier), qui développe des études intégratives sur les réponses de l'arbres aux stress abiotiques avec notamment l'intégration d'approches écophysiologiques et moléculaires, l'**IMFT** (Institut de Mécanique des fluides de Toulouse) et l'unité **BIA INRA** (Biopolymères, Interactions, Assemblage). Les propriétés mécaniques des ponctuations ont été étudiées par le partenaire IMFT avec notamment des techniques d'AFM (Atomic Force Microscopy). La composition des membranes des ponctuations a été étudiée par le partenaire BIA, avec des approches d'immuno-marquage. Ce travail de thèse se focalise sur les propriétés moléculaires et mécaniques des ponctuations chez les angiospermes en lien avec la vulnérabilité à la cavitation.

Ce travail de thèse s'articule en deux chapitres. Dans un premier chapitre, nous avons développé un modèle mécanique de comportement des ponctuations lorsqu'elles sont soumises à des différences de pression. Ce modèle a pour but d'intégrer les différentes dimensions d'une ponctuation afin de prédire leur comportement mécanique à différente pression et de tester son leur

importance pour la vulnérabilité à la cavitation. Le modèle permet de comparer des espèces contrastées pour leur vulnérabilité à la cavitation. D'autre part, nous testons l'hypothèse que les membranes des ponctuations qui sont soumises à des différences de pression subissent des déformations.

Dans un deuxième volet, nous avons développé une approche gène candidat pour prospecter les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Les arbres transgéniques permettent d'étudier la fonction de gènes identifiés par des approches génomiques (Mellerowicz et al., 2001; Chaffey et al., 2002) et représentent des modèles utiles pour comprendre les bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation. Récemment, notre étude sur 10 lignées transgéniques modifiées pour l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lignines montre que des modifications du métabolisme des lignines induit une augmentation de la vulnérabilité à la cavitation (Awad et al., 2012). Cependant, la manière dont les lignines peuvent affecter la vulnérabilité à la cavitation demeure non élucidée. Dans ce travail de thèse, nous avons construit des lignées transgéniques de peupliers surexprimant des gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi primaire en ciblant les pectines. Les pectines ont été sélectionnées car ce sont des cibles spécifiques de la paroi primaire et car elles sont impliquées dans la porosité et les propriétés mécanique de la paroi (Zhang and Staehelin, 1992; Carpita and Gibeaut, 1993). Les choix de gènes candidats et constructions seront développés dans la partie introduction de ce chapitre. La génération de lignées transgéniques de peupliers est un processus long et l'approche gène candidat présente un risque élevé car les gènes testés par une telle approche sont peu nombreux. C'est pourquoi nous avons testé le potentiel d'*Arabidopsis thaliana* comme modèle d'étude des bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. *Arabidopsis thaliana* présente de nombreux avantages avec l'existence de larges collections de mutants pour des gènes dont la fonction est caractérisée. Cette plante a déjà été proposée comme modèle pour prospecter les bases génétiques de la formation de bois, la différenciation des cellules cambiales et la biosynthèse de lignines (Chaffey et al., 2002; Boerjan et al., 2003; Ko et al., 2004; Nieminen et al., 2004). Nous avons donc testé la possibilité d'utiliser cette plante modèle pour appréhender les fonctions hydrauliques du xylème, plus particulièrement la vulnérabilité à la cavitation. Les variabilités génétique et phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation de l'espèce ont notamment été étudiées. Des études menées sur d'autres herbacées nous amènent à penser que cela est réalisable (Mencuccini and Comstock, 1999; Cochard, 2002b; Kocacinar and Sage, 2003; Stiller et al., 2003; Li et al., 2009; Maherali et al., 2009; Saha et al., 2009). Le défi technique de cette approche est davantage lié à la petitesse des échantillons analysable sur cette espèce.

Les résultats du travail de thèse sont présentés sous la forme de deux chapitres incluant les publications issues de ce travail et présentant successivement d'autres résultats non publiés.

- **Le 1^{ier} chapitre porte sur l'implication de la géométrie des ponctuations dans la vulnérabilité à la cavitation.** Le modèle mécanique de déformation des membranes permet d'expliquer la variabilité interspécifique de la vulnérabilité à la cavitation. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis au journal « *Annals of Botany* ».

- **Le 2nd chapitre porte sur** les bases moléculaires et génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Elles sont appréhendées par une approche basée sur la génération de lignées transgéniques et une autre basée sur l'utilisation d'*Arabidopsis thaliana* comme plante modèle. Cette dernière a fait l'objet d'une publication dans « *Journal of Experimental Botany* ». Le modèle *Arabidopsis thaliana* nous a permis aussi d'apporter des preuves de l'importance de la vulnérabilité à la cavitation pour l'adaptation à des milieux contraignants et de son probable lien avec le port ligneux de certaines espèces. Ces hypothèses sont développées dans une revue sur l'importance de la vulnérabilité à la cavitation dans l'adaptation des espèces. Cette revue est publiée dans « *Current Opinion in Plant biology* ».

RESULTATS

CHAPITRE 1

MODELE MECANIQUE DE COMPORTEMENT DES PONCTUATIONS LORSQU'ELLES SONT SOUMISES A DES DIFFERENCES DE PRESSION

Le modèle développé dans ce chapitre permet d'intégrer les dimensions d'une ponctuation pour calculer les déformations qu'elle expérimente lorsqu'elle est soumise à une différence de pression. Il permet de comparer des espèces contrastées pour leur vulnérabilité à la cavitation et explique une partie de la variabilité interspécifique.

Original Article

Modelling the mechanical behaviour of pit membranes in bordered pits with respect to cavitation resistance in angiosperms

Authors:

Aude TIXIER^{1,2}, Stephane HERBETTE^{1,2}, Steven JANSEN³, Marie CAPRON⁴, Philippe TORDJEMAN⁴, Hervé COCHARD^{2,1}, Eric BADEL^{2,1*}

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177, Aubière, France

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

³ Institute for Systematic Botany and Ecology, Ulm University, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081, Ulm, Germany

⁴ Université de Toulouse, INPT-CNRS, Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse, Allée du Professeur C. Soula, 31400 Toulouse, France

Running title: Mechanical behaviour of bordered pits

Corresponding author: eric.badel@clermont.inra.fr

Abstract

Background and aims: Various correlations have been identified between anatomical features of bordered pits in angiosperm xylem and vulnerability to cavitation, suggesting a physical role of the pit structure. However, little is known about how the geometry of bordered pits affects the mechanical behaviour of the pit membrane and its vulnerability to cavitation.

Methods: Transmission electron microscopy (TEM) was applied to quantify the pit micromorphology of species that showed contrasting differences in vulnerability to cavitation. Anatomical characters were then included into a mechanical model that was based on the Kirchhoff-Love thin plate theory. We proposed a mechanistic model that included the geometrical features of pits in order to evaluate the resulting pit membrane strains. This approach allowed us to investigate the impact of the pit geometry on its mechanical behaviour and to estimate the impact on air-seeding resistance.

Key results: TEM observation enlightened residual strains of the pit membrane during cavitation. The mechanical modelling revealed the interspecific variability of the strains experienced by the pit membrane according to the pit geometry and pressure. It is demonstrated that cavitation occurs after the pit membrane has been deflected against the pit border. Interspecific variability of the strains was correlated with vulnerability to cavitation. Assuming that air-seeding occurs for a given pit membrane strain, the pressure predicted by our model to achieve this mechanical state corresponded to experimental values of cavitation sensitivity (P50).

Conclusions: Our results show a functional understanding of the importance of the pit geometry and pit membrane structure in air-seeding.

Key words: air-seeding, cavitation, pit, mechanical modelling, strain, anatomy, *Fagus sylvatica*, *Sorbus aria*, *Populus tremula*, *Carpinus betulus*, TEM.

Introduction

Xylem sap is transported under negative pressure according to the accepted cohesion-tension theory (Angeles *et al.*, 2004). When a large negative sap pressure increases during drought, air could be aspirated into a functional conduit through pores in its wall through a phenomenon called cavitation (Cochard 2006; Lens *et al.*, 2013). Cavitation may result in an air embolism that leads to a loss of the hydraulic conductance (Cochard 2006). Xylem embolism represents an important constraint on plant survival and productivity (Brodribb and Cochard 2009; Choat *et al.*, 2012). Thus, xylem functional traits must perform the balance between water flow efficiency and safety against air entry and propagation in the hydraulic conduit network (Tyree and Zimmermann 2002).

Since the ascent of water between angiosperm vessels involves the crossing of many bordered intervessel pits, the behaviour of the pit membranes is a key factor for controlling water movement (Shane *et al.*, 2000; Tyree and Zimmermann 2002). On the one hand, the flow resistance through intervessel pits accounts for more than 50 % of the total resistance of the vessel network in angiosperms (Wheeler *et al.*, 2005; Hacke *et al.*, 2006). On the other hand, they represent the main site for air entry into a functional vessel (Tyree and Sperry 1989a). Altogether, their structure has been reported to reflect a compromise between efficiency and safety of the water flow (Tyree and Sperry 1989a; Choat *et al.*, 2009; Jansen *et al.*, 2009). Cavitation would occur as air bubbles would seeds from an embolized conduit through pores of intervessel pits (Tyree and Zimmermann 2002; Cochard 2006). When an embolized vessel is connected by a bordered pit to a functional vessel under tension, a pressure difference develops between both sides of the pit membranes. Drought-induced embolism resistance is determined by both qualitative and quantitative pit characteristics (Lens *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, in press). The probability of air entry into a vessel would increase in a stochastic fashion with its pit area (pit quantity). Considering variability in the porosity of pit membranes and the Laplace law, the largest pore of the intervessel pit area will determine air-seeding. The larger the pore, the higher the chance for the air to spread and to cavitate the vessel (Tyree and Sperry 1989b; Cochard 2006). The importance of the pit quantity in vulnerability to cavitation has been proposed as the rare pit hypothesis (Christman *et al.*, 2009). A strong correlation between cavitation resistance and the average area of pit overlap between vessels was found for > 80 species (Wheeler *et al.*, 2005; Hacke *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, in press). However, this correlation may not be valide when considering a relatively narrow range of cavitation resistance, suggesting also the importance of qualitative pit features such as pit membrane thickness (Lens *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, in press).

Recent studies suggested the importance of the structure of pits in xylem functional traits, illustrating interspecific and intraspecific variation of pit membrane porosity (Choat *et al.*, 2003, 2008; Sano 2005; Jansen *et al.*, 2009). Pit membrane thickness has been shown to be correlated with pit membrane porosity and thus with the pressure threshold required to force gas across intervessel pit field (Jansen *et al.*, 2009). Intriguingly, the pore size calculated to allow air-seeding was always greater than the pore size measured using perfusion with colloids or *SEM* (Choat *et al.*, 2009; Jansen *et al.*, 2009). The discrepancy between observed and calculated pore size can be explained by many ways related to microscope techniques and preparation artefacts. Firstly, microscope methods show limitations for measuring pore sizes in thick membranes (Jansen *et al.*, 2009). Secondly, it is difficult to find the largest pore responsible for air-seeding. Thirdly, pits observed under *SEM* or *TEM* are typically in a relaxed (i.e., non-aspirated) state, whereas pit membrane pores may enlarge by stretching when they undergo a pressure difference across two neighbouring conduits (Tyree and Zimmermann 2002; Sperry and Hacke 2004; Choat *et al.*, 2004). Silicon injection under pressure allowed the observation of the deflection of pit membranes against the outer pit aperture (Choat *et al.*, 2008), illustrating the stretching properties of pit membranes (Thomas 1972). In such case, porosity could increase by rupture or reversible stretching of the pit membrane (Sperry and Hacke 2004). This stretching would then be a function of i) geometrical characteristics of the membrane and the pit chamber, and ii) the intrinsic mechanical properties of the membrane. Experiments based on colloidal gold perfusion across pit field showed that increasing pressure allowed the perfusion of larger particles through intervessel pit fields (Choat *et al.*, 2004). Moreover, since no colloidal gold was found to penetrate pit fields when the pressure was decreased, this study suggested that the increasing pressure difference generated the stretching of the pit membrane.

These recent results converge to the hypothesis that the mechanical behaviour of the pit structure could be a key point in cavitation resistance. Lens *et al.* (2011) showed a correlation between the pressure required to reduce hydraulic conductance by 50% (P_{50}) and various pit anatomical features in *Acer* species. Correlations were found for the pit chamber depth, the pit membrane thickness, the pit chamber diameter and the aperture fraction. A mechanistic explanation integrating bordered pit parameters is needed to understand how pit morphological features may control vulnerability to cavitation. As far as we know, the effects of pit geometry on the degree of stretching of the pit membrane have not been quantified. Sperry and Hacke (2004) proposed a model of the membrane deflection in response to pressure difference assuming the membrane structure as a superposition of microfibril spokes

with a modulus of elasticity being dependant of one spoke (5GPa). These authors took into account the diameter and depth of the chamber.

Here we propose a mechanical model of the pit membrane under a pressure difference between neighbouring conduits. We also bring evidence that a pit membrane undergoes strains and our model allows quantifying these strains experienced by the pit membrane. We investigated several species with varying cavitation resistance and bordered pit anatomy to test how mechanical properties based on our model scale with vulnerability to cavitation.

Materiels and methods

Plant material

Sorbus aria L., *Carpinus betulus* L., *Fagus sylvatica* L., and *Populus tremula* L. branches were harvested in September 2011 from the Allagnat forest in the center of France (45°45.23' N, 2°56.26' E, 1,000 m above sea level). To avoid light effects (Herbette *et al.*, 2010), we harvested only fully sun exposed branches. Samples of 50 cm long were cut from the plants, wrapped in humid paper and kept at 5 °C in a sealed black plastic bag for a maximum of six days. Three samples per species were collected from one to three individus. Vulnerability to cavitation measurements and transmission electron microscope (*TEM*) analyses of pits were performed on samples from the same branches.

Vulnerability to cavitation

Xylem vulnerability to cavitation was assessed using the Cavitron (Cochard 2002; Cochard *et al.*, 2005) on 0.28 m-long stem samples. The centrifugal force increases water tension in branch segments and allows at the same time measuring the loss of hydraulic conductance. A vulnerability curve was built by plotting the percentage loss of xylem conductance (*PLC*) versus xylem water tension in three branches per species. A sigmoidal function was fitted for each curve using the following equation (Pammenter and Vander Willigen 1998):

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{(S(P-P_{50})/25)}}$$

where P_{50} is the pressure causing 50 % loss of conductance, and S the slope of the curve at this point. In order to prospect the effect of pressure difference on pit membranes, branches of *F. sylvatica* and *P. tremula* were submitted to a -4 MPa pressure with the centrifuge. Then, the central parts of the branches, which correspond to the area with the highest centrifugal forces, were prepared for *TEM* analysis of pits.

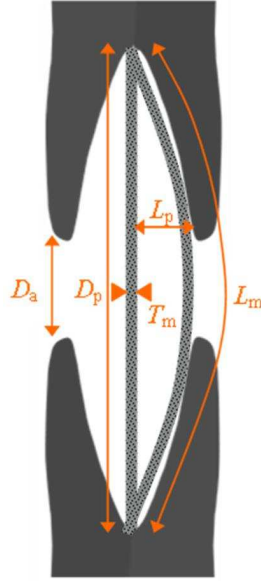


Fig 1: Diagram of a bordered pit as seen in transverse section. Grey dotted lines show a relaxed and aspirated pit membrane. Abbreviations of relevant features are indicated. T_m = pit membrane thickness, L_m = pit membrane length, D_p = pit diameter, L_p = pit chamber depth, D_a = pit aperture diameter.

Table 1: List of parameters of the pit model with symbols, units, definitions, and equation:

| Symbol | Unit | Definition | Equation |
|-------------------------|-------------------------------------|--|--|
| <i>Constants</i> | | | |
| E | Pa | Young's modulus of pit membrane | |
| ν | - | Poisson's ratio = 0.3 | |
| <i>Input variables</i> | | | |
| L_m | μm | Pit membrane length | |
| D_p | μm | Pit chamber diameter | |
| L_p | μm | Pit chamber depth, i.e. the distance from the pit membrane surface to the inner pit aperture | |
| D_a | μm | Pit aperture diameter | |
| T_m | μm | Pit membrane thickness | |
| ϵ_{res} | - | Residual plastic strain | $\epsilon_{\text{res}} = (L_m - D_p) / D_p$ |
| <i>Output variables</i> | | | |
| D | $\text{MPa} \cdot \mu\text{m}^3$ | Pit membrane flexural rigidity | $D = (E \cdot T_m) / [12 (1 - \nu^2)]$ |
| ϵ | - | Maximum pit membrane strain | $\epsilon_1 = 3 \cdot D_p \cdot (1 - \nu^2) P / (8 E \cdot T_m)$ if $P < P_b$ $\epsilon_2 = 3 \cdot D_p \cdot (1 - \nu^2) P (1 + \epsilon_1) / (8 E \cdot T_m) + \epsilon_1$ if $P > P_b$ |
| WI_a | $\mu\text{m} \cdot \text{MPa}^{-1}$ | Pit membrane deflection index | $WI_a = (D_a / 2)^4 / (64 \cdot D)$ |
| P_b | MPa | Pressure required to deflect the membrane against the inner aperture | $P_b = (64 \cdot D \cdot L_p) / [(D_m / 2)^2 - (D_a / 2)^2]^2$ |

Transmission electron microscopy

Three stem samples of *S. aria*, *C. betulus*, *F. sylvatica* and *P. tremula* were embedded for TEM analysis of pits. Samples were fixed overnight at room temperature using Karnovsky's solution (Karnovsky 1965). They were then washed in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) and post fixed in buffered 1 % osmium tetroxyde for 4 h at room temperature. Six-washings of 5 min using phosphate buffer were performed and samples were gradually dehydrated in ethanol at 4 °C. Samples were embedded in LR white resin (London Resin Company, Reading, UK), which gradually replaced the ethanol. When 100 % LR white resin was reached, the resin was polymerized for 2 days at 55 °C in air-free tubes. Transverse sections with a thickness of 60-90 nm were stained with uranyl acetate for 10 min and lead citrate for 1 min. TEM observations were carried out using a JEOL JEM1210 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV accelerating voltage and with Hitachi H7650 TEM. Image analysis was performed using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012) with at least 24 intervessel pits studied for each species. Pit features measurements (Fig. 1, Table 1) were performed on images with pits showing two apertures. We measured pit membrane thickness (T_m), pit chamber depth (L_p), which is defined as the distance from the unspirated pit membrane to the inner pit aperture, pit chamber diameter along its diametral axis (D_p), and pit aperture diameter (D_a). T_m data was the mean value of three measurements per pit membrane. L_p and D_a data were the mean values of two measurements per pit. For *P. tremula* and *F. sylvatica*, pit membrane length (L_m) and D_p were measured and compared between samples submitted -4 MPa and samples not subject to centrifugal forces. Residual strains (ϵ_{res}) were calculated as:

$$\epsilon_{res} = (D_p - L_m) / D_p$$

Data from literature

Anatomical and P_{50} data were compiled from previous studies (Sperry and Hacke 2004; Jansen *et al.*, 2009; Plavcová *et al.*, 2011; Lens *et al.*, 2011; Plavcová and Hacke 2012). We considered studies for which at least T_m , D_p , and P_{50} were measured. Lens *et al.* (2011) compiled T_m , D_p , L_p , D_a and P_{50} data for six *Acer* species: *A. negundo* L., *A. glabrum* Torr. (including var. *glabrum* and var. *diffusum*), *A. grandidentatum* Nutt., *A. saccharinum* L., *A. platanoides* L., *A. pseudoplatanus* L.. Jansen *et al.*, (2009) compiled T_m , D_p for 12 angiosperms species: *Corylus avellana* L., *Fraxinus americana* L., *Ilex aquifolium* L., *Olea europaea* L., *Populus fremontii* S. Watts., *Quercus robur* L., *Salix alba* L., *Sambucus nigra* L., *Sophora japonica* L., *Laurus nobilis* L., *Betula nigra* L., and *Betula pendula* Roth. Corresponding P_{50} values were extracted from Choat *et al.* (2012). D_a measurements were

added for *Olea europaea* and *Laurus nobilis*. T_m , D_p , D_a and P_{50} from *Nerium oleander* L. and *Populus trichocarpa* x *deltoides* (clone H11-11) were reported by Sperry and Hacke (2004) and by Plavcová *et al.* (2011), Plavcová and Hacke (2012), respectively.

Model description

We modelled the mechanical behaviour of the pit membrane in order to quantify i) the effect of the pressure difference on the strain, ii) the pressure that is required to deflect the membrane against the pit aperture, and iii) the behaviour of the pit membrane beyond the aspiration pressure.

The model assumed circular membranes and was based on Kirchhoff-Love thin plates theory (Bauchau and Craig 2009). Basic axioms of this theory consider a continuous, elastic and homogeneous circular plate that i) can bend in two directions and twist, ii) is initially flat and, iii) shows a transverse dimension (thickness) that is small compared to the diameter. This latter axiom allowed neglecting shears effects. As a boundary condition, the pit membrane was supposed to be clamped to the pit border. Finally, the pressure was assumed to be uniform on the whole membrane area.

Flexural rigidity (D) of the membrane was calculated as the force couple required to bend the membrane to a unit curvature.

$$D = \frac{(E T_m^3)}{12(1-\nu^2)} \quad (1)$$

where E is the Young's modulus of pit membrane and ν is its Poisson's ratio. The Young's modulus is the ratio of stress (σ , [Pa]) to strain (ϵ , []) and measures the elasticity of a material. Using Atomic Force Microscopy (AFM) on fresh samples, the Young modulus for intervessel pit membranes in *Populus deltoids* was found to be around 400 MPa (unpublished data). Although the available evidence suggests that intervessel pit membranes in angiosperms may show a larger variation in their ultrastructure and chemical composition than previously thought, we assume that this Young modulus is constant across angiosperm species. Moreover, the Poisson coefficient ν , which refers to the transversal contraction of the material, was estimated to be 0.3 for all our computations because most polymers exhibit values of about 0.3. Moreover, this value is in line with the ν value for cellulose (Nakamura *et al.*, 2004), which represents the main component of intervessel pit membranes. Considering these elasticity parameters as constants permitted us to focus on how the pit geometry is involved in the interspecific variability of vulnerability to cavitation.

Following the above axioms, the deflection (W) of a membrane that experiences a uniform pressure (P) fulfils the following equation:

$$\nabla^4(W(r)) = \frac{P}{D} \quad (1)$$

In case of a circular membrane, the Nabla operator (∇) can be written in circular coordinates as follows:

$$\frac{d}{dr} \left(\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dW(r)}{dr} \right) \right) = \frac{P}{D} \quad (2)$$

where r is the radial position from the center of the membrane. Solving this equation using the above-written boundary conditions, leads us to the relation

$$W(r) = \frac{(R^2 - r^2)^2}{64 D} P \quad (3)$$

where R is the radius of the membrane ($R = D_p / 2$). Solving equation (2) for r being equal to the radius of the aperture ($r = D_a / 2$) and W being equal to L_p enabled us to evaluate the pressure required to deflect the pit membrane against the aperture (P_b).

$$P_b = \frac{1}{3} \frac{E}{(1-\nu^2)} \frac{T_m^3}{(D_p^2 - D_a^2)} L_p \quad (4)$$

The strain is the degree of the pit membrane deformation. When P increases, the strain increases as the pit membrane is stretched. According to the mechanical model, the maximum strain level (ε_{\max}) occurs at the centre of the pit membrane and increases linearly with P :

$$\varepsilon_{\max} = \varepsilon(r=0) = -\frac{3}{8} \frac{(1-\nu^2)}{E} \frac{R^2}{T_m^2} P \quad (5)$$

When $P < P_b$, $R = D_m / 2$. However, when $P > P_b$, the peripheral area of the membrane is supported by the pit border and only the membrane region that is not supported by the pit border should be considered for deformation. In this case, assuming that no further displacement occurs at the aperture boundary, we can consider the previous equations (2) and (5) with $R = D_a / 2$

$\bar{\varepsilon}$ represents the increase in length. In order to calculate $\bar{\varepsilon}$ for a given pressure, it was assumed that the membrane expands to form a spherical arc:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\rho}{R} a \sin \left(\frac{R}{\rho} \right) - 1 \quad (6)$$

where ρ is the radius of the sphere in which the deformed membrane is inscribed.

$$\rho = \frac{(R^2 + W(0)^2)}{2 W(0)} \quad (7)$$

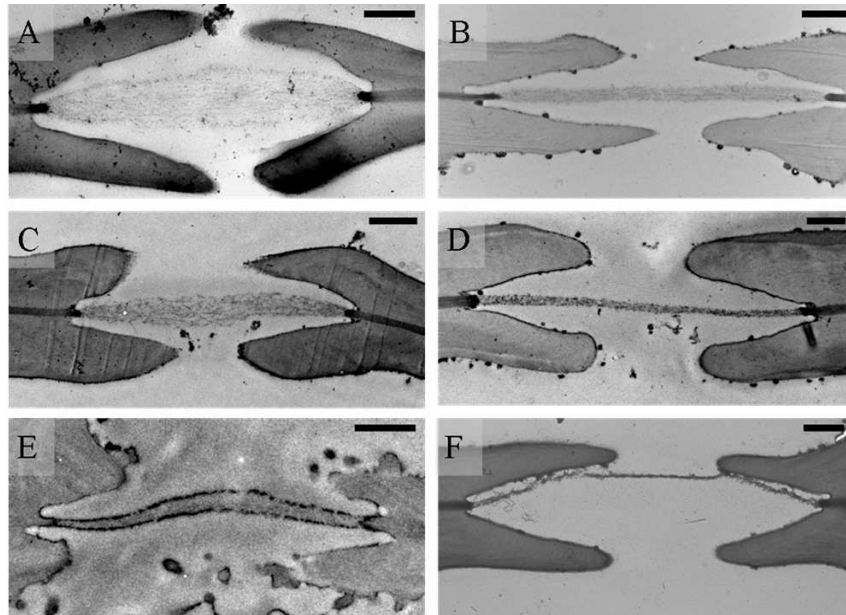
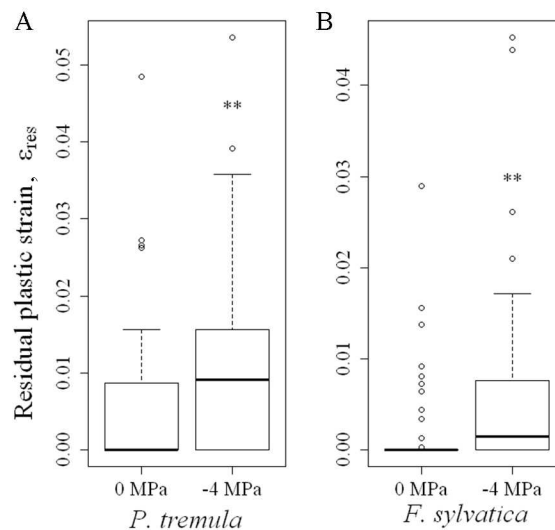


Fig. 2: TEM images of bordered intervessel pits from 4 species with contrasting vulnerability to cavitation. *Sorbus aria* (A, $P_{50} = -5.67 \text{ MPa} \pm 0.17$, mean value \pm SE), *Carpinus betulus* (B, $P_{50} = -4.17 \text{ MPa} \pm 0.06$), *Fagus sylvatica* (C, E, $P_{50} = -3.18 \text{ MPa} \pm 0.16$) and *Populus tremula* (D, F, $P_{50} = -2.42 \text{ MPa} \pm 0.03$). TEM images are representative pictures of pits observed in control stems (A - D) or stems submitted to a xylem pressure of - 4 MPa (E - F). TEM analysis and vulnerability curves were performed on similar branch samples. Scale bar = 1 μm .



with $R = D_m / 2$ if $P < P_b$, and $R = D_a / 2$ if $P > P_b$.

Finally, we computed a deflection index (WI_a) on the aperture that was calculated on the basis of equation (2). This index considered the membrane area that was unsupported by the aperture and was not dependant on pressure.

$$WI_a = \frac{(D_a / 2)^4}{64D} \quad (8)$$

The mechanical parameters derived from morphological pit features are reported in Table 1.

Results

Vulnerability to cavitation

Vulnerability to cavitation showed significant differences for P_{50} according to a student t-test. Mean P_{50} (\pm SE) were -5.67 MPa (\pm 0.17) for *S. aria*, -2.42 MPa (\pm 0.03) for *P. tremula*, -3.18 MPa (\pm 0.16) for *F. sylvatica* and -4.17 MPa (\pm 0.06) for *C. betulus* of. PLC values for samples submitted to -4 MPa were 76.7 % (\pm 7.4) and 100 % (\pm 0.0) for *F. sylvatica* and *P. tremula*, respectively.

Quantitative pit characteristics and model inputs

The four species studied showed considerably variation in their pit morphology (Fig. 2A - D). Intervessel pits differed in their pit membrane thickness, but also in diameter, chamber depth, and aperture diameter. In addition, differences in pit membrane position and length were observed between pits from control samples of *F. sylvatica* and *P. tremula* (Fig. 2C - D), and pits submitted to a pressure difference of -4 MPa (Fig. 2E - F). The frequency of aspirated pit membrane was clearly higher for -4 MPa samples (2% for *F. sylvatica* and 17% for *P. tremula*) compared to the control (0 MPa) samples (0% and 8% for *F. sylvatica* and *P. tremula*, respectively) (Fig. 2E). Samples of *F. sylvatica* showed a low number of aspirated pit membranes, but deformation of the pit membrane could be seen (Fig. 2F). In addition, the thickness of the pit membrane in aspirated and deformed pit membranes was found to decrease compared to the control conditions. Pit membranes that were aspirated or deformed also showed a higher electron density and were less transparent under TEM than the control samples.

The residual deformation ϵ_{res} (Fig. 3) ranged from 0 to 0.035 for pit membranes of *P. tremula* and from 0 to 0.017 for *F. sylvatica*. ϵ_{res} was significantly different between control samples and -4 MPa samples for both species. *P. tremula* showed significantly higher ϵ_{res} than *F. sylvatica*, which is less sensitive to cavitation.

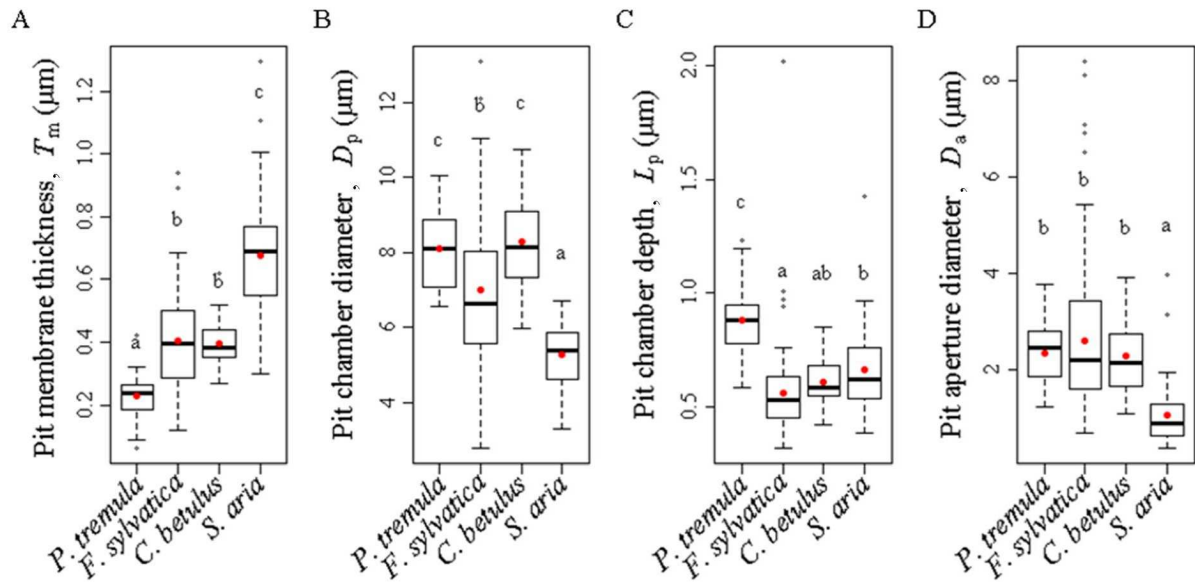


Fig. 4: Comparison of pit anatomical features measured in 4 species with contrasting vulnerability to cavitation. Three stem samples were prepared for TEM. Pit membrane thickness (T_m), pit diameter (D_m), pit chamber depth (L_p), and pit aperture diameter (D_a) were measured under TEM for 24 to 69 pits per species. Red dots represent mean values and letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey). The species order from left to right is according to increasing cavitation resistance.

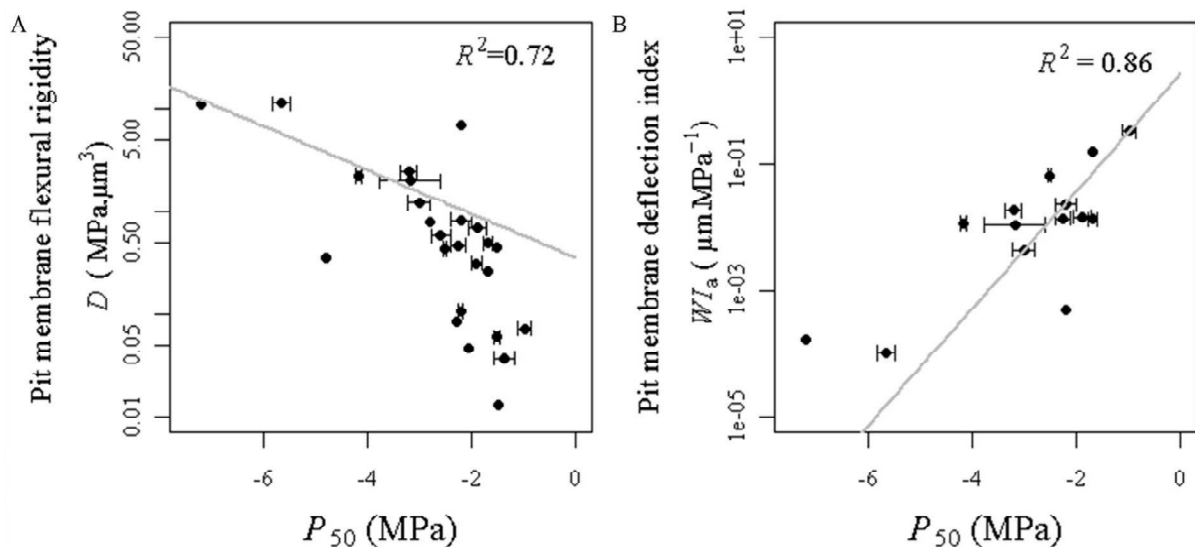


Fig. 5: Relationships between mechanical properties of the pit membrane (D , WI_a) and P_{50} . Pit membrane flexural rigidity (D) was calculated based on the pit membrane thickness (T_m) for 25 angiosperms species (A). Pit membrane deflection index (WI_a) was calculated using mean pit values of T_m and D_a for 14 angiosperms species (B). Data are means values (\pm SE). The Y-axis is log scaled. Exponential regression lines are indicated in grey.

An overview of the pit features for the species studied is shown in Fig. 4. The T_m , D_p , L_p and D_a values varied considerably in magnitude. Values of D_p for *P. tremula* and *C. betulus* were similar, but were higher than D_p values of *F. sylvatica* and *S. aria*. L_p and D_a showed limited interspecific variability. Nevertheless, *P. tremula* showed pits with significantly deeper chambers (L_p) than other species, and pits of *S. aria* pits had a significantly larger pit aperture diameter (D_a).

There were also differences in intraspecific variability. *F. sylvatica* had the highest variability for D_m (Fig. 4B) and D_a (Fig. 4D), while *F. sylvatica* and *S. aria* had high variability for T_m (Fig. 4A).

Mechanical characteristics of the pits structure and model outputs

Figure 5 shows the relationship between the mechanical properties of the pits (D , WI_a) and P_{50} . Pit membrane flexural rigidity (D) was calculated based on T_m for 25 angiosperm species including the four species studied. D showed an exponential relationship with P_{50} ($R^2 = 0.72$). The pit membrane deflection index (WI_a) was calculated using T_m and D_a for 14 angiosperm species and showed a strong relationship with P_{50} ($R^2 = 0.86$).

The measurements of D_m , D_a , T_m and L_p for *S. aria*, *C. betulus*, *F. sylvatica* and *P. tremula* (Fig. 4) allowed modelling the maximum (ϵ_{max}) and mean ($\bar{\epsilon}$) pit membrane strain as a function of pressure (P) (Fig. 6). The maximum strain (Fig. 6A) occurs at the centre of the membrane, whereas the mean strain (Fig. 6B) represents the increase in the total membrane length. When the pit membrane reaches the aperture and is fully aspirated at the P_b pressure, there is a breakpoint in the strain function. Beyond this P_b value, only the pit membrane area that is not supported by the borders is deformed. The membrane strains ranged from 0 to 0.15. A different behaviour in pit membrane strain was observed for a low pressure. When P was higher than 2 MPa, species with higher vulnerability to cavitation tended to experience higher levels of strain. When P exceeded P_b , the slope of the strain was higher for ϵ than for $\bar{\epsilon}$.

The relationship between the mechanical properties based on our model and the vulnerability to cavitation was tested in 11 angiosperm species (Fig. 7). P_b and P_{50} (Fig. 7A) were strongly correlated ($R^2 = 0.73$). In general, P_b was lower than 1 MPa, and less negative than the P_{50} value for all species studied, except for *S. aria*.

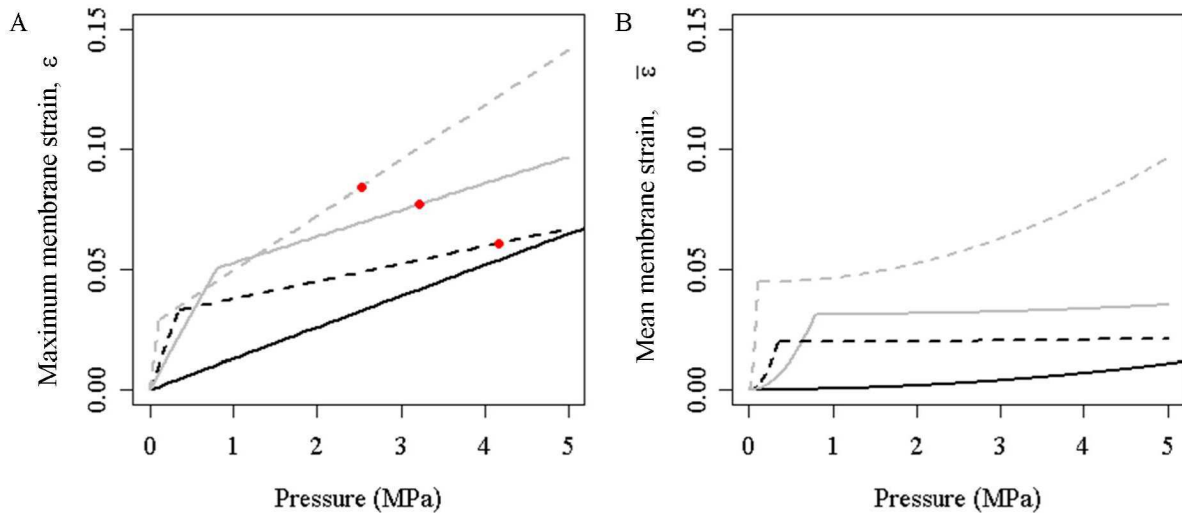


Fig. 6: Maximum pit membrane strain (ϵ_{max}) vs pressure in 4 species with contrasting vulnerability to cavitation. Mean values of pit features were used to calculate pit membrane maximum (ϵ) and mean ($\bar{\epsilon}$) strain in *S. aria* (black line), *C. betulus* (black dotted line), *F. sylvatica* (grey line), and *P. tremula* (grey dotted line). The maximum strain occurs at the center of the membrane, whereas the mean strain represents the relative increase in membrane length. Strains increase as the pit membrane is aspirated against the pit border. When the pit membrane reaches the pit border for a given pressure P_b , there is a breakpoint in the strain function. The P_b pressure differs between the species and can be deduced from the change in the slope of the strain function. Beyond this P_b value, only the pit membrane area that is unsupported by the aperture is deformed. Red dots on Fig 6A indicate the P_{50} value of three out of four species.

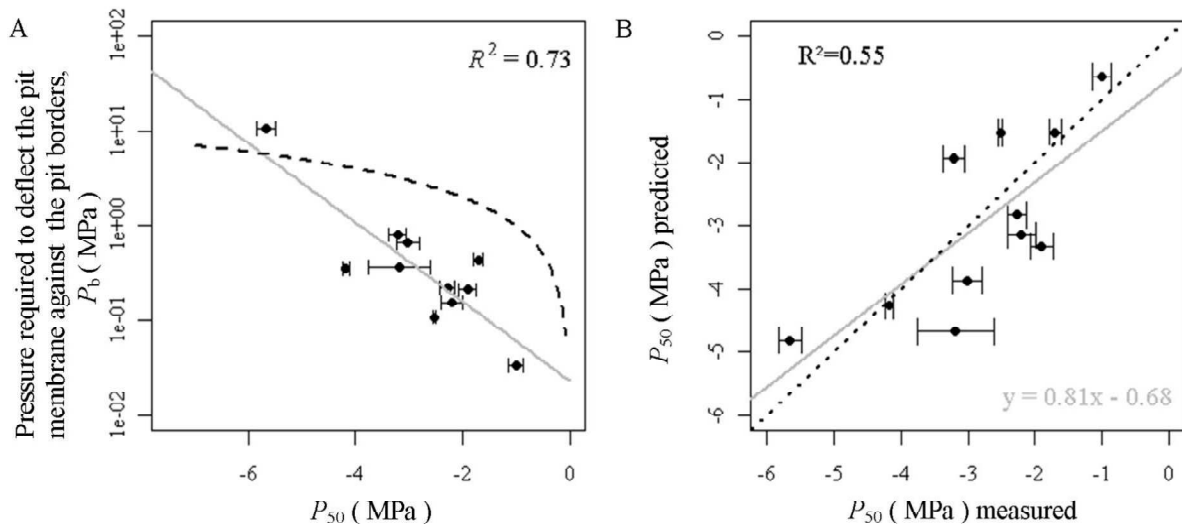


Fig. 7: Relationships between mechanical properties of bordered intervessel pits and P_{50} . The relationship was tested for *S. aria*, *C. betulus*, *F. sylvatica*, *P. tremula*, and 6 *Acer* species. P_b was deduced from bordered pit features and plotted against P_{50} values measured experimentally (A). Assuming the air-seeding occurs for a given maximum membrane strain ($\epsilon=0.06$), the model allowed us to evaluate the corresponding P_{50} pressure which is compared with experimental P_{50} values. (B). Data are means values (\pm SE). In Fig. 7A, the Y-axis is log scaled, exponential regression lines are grey and the black dotted line represents the $P_b = P_{50}$ line.

Discussion

Our results provide experimental evidence that the pit membrane may undergo strains during air-seeding events. We propose a model of a pit membrane that undergoes a pressure difference between neighbouring conduits. This integrative model considers various morphological features of the bordered pit. The mechanical output of the model showed that variability of the pit features leads to a great interspecific variability of the pit membrane strains for a given pressure. These strains were correlated with P_{50} among the species studied and permitted us to present a functional understanding of the importance of the pit geometry in vulnerability to cavitation.

Modelling the pit membrane behaviour under pressure

Mechanical behaviour of the pit membrane in response to pressure is a function of its structure, which is determined by quantitative (Fig. 1) and qualitative variables. The pit membrane elasticity (E) or its Poisson's coefficient (ν) depends on the composition and microstructure of the membrane (Herbette and Cochard 2010; Lens *et al.*, 2013). So far, interspecific variability of E has not been investigated yet because of the technical difficulty in applying AFM measurements on wet (i.e., fresh) pit membranes (Pesacreta *et al.* 2005; Zwieniecki and Secchi 2012). Nevertheless, considering ν and E as constant parameters permitted us to focus on the role of the pit geometry and its involvement in the interspecific variability to cavitation resistance. Moreover, we should consider the point that we modelled the aspirated pit membrane as a clamped circular plate that does not slip against the pit border.

The statistic distribution of the geometrical features was variable and depended on the species, suggesting also that the measurements of a high number of pits is required in order to evaluate the mean character of a species. Pits differed in their pit membrane thickness, which is correlated with the pore size (Jansen *et al.*, 2009). We show that the pit membrane thickness can also be a trait influencing the mechanical behaviour of the pit membrane. Effects of the pit membrane thickness on its porosity and mechanical behaviour could be complementary and explain the strong correlation of this anatomical feature with P_{50} . The species studied also showed variation in terms of pit diameter, pit chamber depth, and pit aperture diameter. While *F. sylvatica* and *C. betulus*, for instance, show similar T_m values, T_m only does not explain the clear difference in vulnerability to cavitation between both species. T_m , D_a , D_p , and L_p differed among the species studied in relation to their vulnerability to cavitation. Despite good results obtained with our mechanical model, some limitations should also be considered with the use

of mean values as the variability in pit morphology can not be neglected. Another shortcoming of our model is that it is based on circular pit membranes. However, an elliptic pit shape is common, and considerable variation among the species studied was found for D_a and D_p in *F. sylvatica*. Our results also illustrate that it is important to compute the mechanical parameters using the full range of morphological variation of pit characters and not to compute mechanical parameters using mean values. While *TEM* images do not allow measuring the pit circularity, *SEM* observations showing the surface view of bordered pits would be required to quantify circularity.

Relationship between pit geometry and vulnerability to cavitation

Although *F. sylvatica* and *C. betulus* had similar values for T_m , they had different pit chamber geometry, especially D_p . Modelling of the pit behaviour showed that high pressure generated contrasted interspecific strains that could explain their great difference in vulnerability to cavitation. The relationship found by Lens et al. (2011) between L_p and P_{50} was not observed in the four species we studied. In order to understand the involvement of the pit geometry in vulnerability to cavitation, the anatomical features of the pit were integrated into the ε values.

The residual strains in pit membranes we observed after cavitation events in *P. tremula* and *F. sylvatica* (Fig. 3) supported the modelling of pit membrane strains. Differences for residual strains in the pit membrane were observed between *P. tremula* and *F. sylvatica*. The least cavitation resistant species experienced the highest residual strains, suggesting the importance of strains experienced by the membrane to resist to cavitation (Choat et al., 2004). Strains did not only occur in the elastic region of the material, but also in the plastic region, leading to large residual strains. Residual strains, which result from pit membrane degradation, could explain cavitation fatigue (Hacke et al., 2001). Cavitation fatigue has been observed when vessels that underwent a first cavitation event, were after refilling more vulnerable to a new cavitation event.

In order to investigate a relation between pit geometry and vulnerability to cavitation, parameters derived from the model were computed and plotted against P_{50} (Fig. 5). First the membrane rigidity D showed a stronger correlation with P_{50} ($R^2 = 0.72$) than the membrane thickness T_m alone ($R^2 = 0.66$). Moreover, the pit membrane rigidity adds an important mechanical role to T_m with respect to cavitation resistance. WI_a appears to be a relevant parameter to investigate pit membrane behaviour. WI_a integrates D_a , which appears to be an important feature of the pit geometry, and affects the behaviour of an aspirated pit membrane.

In general, the pit aperture D_a represents a rather small and constant fraction of the pit border D_p , with a pit aperture around 10% of the pit membrane area (Lens *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, in press). According to our study, the pressure required to deflect the pit membrane against its aperture is low (< 1 MPa). Also, most of the strain occurs in the aperture. The high correlation between P_{50} and WI_a ($R^2 = 0.86$) argues that this parameter could be a key point for cavitation resistance.

Strains experienced by the membrane represent a suitable parameter to investigate the functional link between mechanical behaviour and resistance to cavitation. On one hand, the strains experienced by the membrane may affect air-seeding via enlarging pores (Choat *et al.*, 2003, 2004; Choat and Pittermann 2009). On the other hand, the pit membrane may encounter some permanent damage, which could also lead to air-seeding (Sperry and Hacke, 2005). The computation of the strains showed contrasting results between the four species (Fig. 6). The pit membranes of *P. tremula*, which was the most vulnerable species, were rapidly deflected against the aperture for a P_b value of 0.11 MPa and then underwent highest strains in the aperture. A thin membrane with a large diameter explained this behaviour. Similarly, the pit membranes of *C. betulus* were rapidly deflected against the aperture for a P_b of 0.35 MPa because of a large membrane area, but the strains increased slowly because of a small aperture diameter that made the structure more rigid. The pit membranes of *F. sylvatica* were aspirated for a higher P_b than for *C. betulus* because of small pit membrane diameters. However, compared to *C. betulus*, pits of *F. sylvatica* had a larger D_a , which resulted in a higher slope of the strain vs pressure (P) function when P exceeded P_b . The lower vulnerability to cavitation for *C. betulus* can thus be attributed to the pit geometry that limits the membrane deformation rather than the intrinsic property of its pit membrane. Finally, the pit structure of *S. aria* required a much higher P_b (10.76 MPa) than the pit membranes of more vulnerable species. A thick membrane bearing a small diameter explained the high value for P_b . The strains experienced by pit membranes in this species at 5 MPa were much lower than the three more vulnerable species. It is noteworthy that the strains experienced at high pressure difference were in accordance with the vulnerability to cavitation of the four species. However, considering the T_m / D_p ratio of pit membranes in *S. aria* ($T_m / D_p = 0.12 \pm 0.007$), the use of the thin plate theory remains questionable. This theory does not involve shear deformations and should only be applicable for pit membranes having a thickness to pit diameter ratio of less than 0.05 (Zietlow *et al.*, 2012). Thus the computations for *S. aria* are likely to underestimate the strains and deflection. This reservation could be applicable to other species and the thick plate theory would be more relevant to model their membrane behaviour.

Figure 7 shows the involvement of the pit geometry in interspecific variability of vulnerability to cavitation. If pressure required to deflect the pit membrane against its aperture (P_b) has no direct mechanistic involvement in air-seeding, its relation with P_{50} is interesting because the P_b parameter (1) integrates all pit features, including membrane, chamber and aperture dimensions, (2) has a strong impact on the strain experienced by the membrane, and (3) reveals different pit strategies among species. A strong correlation with P_{50} was found and P_b seemed always lower than P_{50} except for *S. aria*, confirming the importance of the strains experienced by the membrane when it is deflected against the pit border. Comparison of computed P_b values and P_{50} values suggested that the air-seeding events occur when the pit membrane has already been deflected against the pit border (Fig. 6A). Moreover, we computed the maximum pit membrane strain for $P = P_{50}$ and we observed a low variability. Thus, assuming the P_{50} values correspond to a constant critical pit membrane strain ($\epsilon=0.06$), the model allowed evaluating the corresponding pressure that is required to reach this mechanical state (Eq. 5). This predicted value was then compared to experimental values for a set of 11 species (Fig. 7B). The correlation found suggests that the structure of the pit has a great impact on the cavitation resistance and that the air-seeding occurs when the pit membrane strain exceeds a threshold value that probably corresponds to mechanical damage.

Broadening our model to a larger number of species would gain insight into various evolutionary strategies of angiosperms pit membranes. According to our model, decreasing the diameter of the pit (D_p) showed the largest effect on the strains compared with other features of the pit. However, the correlation between pit diameter only and cavitation resistance tends to be low (Lens *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, in press). This corroborates the idea that not a single feature but various dimensions of the bordered pit can be adjusted and influence cavitation resistance. The gain in decreasing vulnerability to cavitation could be at the cost of a less efficient water flow in the pit chamber. Modelling the pit hydraulic efficiency in relation to the geometry of the bordered pits would be required. Moreover, sensitivity analysis and covariance analysis of pit features would be of interest on a broader dataset of species.

Insight into the mechanism of cavitation

The putative role for the deflection of the pit membrane has been previously suggested (Sperry and Hacke 2004; Choat *et al.*, 2008). Here, residual strains in pit membranes induced during cavitation events in *P. tremula* and *F. sylvatica* (Fig. 3) brought experimental evidence

that the pit membrane undergoes mechanical strains during cavitation. The advantage of *TEM* observations is that residual strains were quantified and compared between species.

Calculation of strains brings insights on the mechanisms of cavitation through air-seeding. First, the low P_b calculated in this study indicates that air-seeding should occur when the membrane is aspirated against the aperture. Thus, air-seeding probably occurs in the central region of the membrane that is not supported by the pit borders and subjected to the maximum strain. The strains experienced on the whole membrane inside the chamber alone cannot explain interspecific variability, because strains occur at low pressures that do not correspond with air-seeding pressure. The strains estimated by our model (Fig. 6) appear realistic, because they were higher than the residual plastic strains (Fig. 3). The membrane deformations would range from 5 to 15% for such high pressures. The resulting enlargement of pores in pit membranes or their formation of micro cracks could be involved in air-seeding. Pore diameters calculated from the Laplace law are always larger than maximum pore diameters measured from *SEM* images (Jansen *et al.*, 2009). Pit membrane strains would increase the pore diameter and could partially explain this difference. Considering the low range of deformation the membrane could experience, and according to the Laplace law, a 10% increase of the pore diameter would be negligible for air-seeding pressure and too weak to explain the discrepancy between observed and expected pore size (Jansen *et al.*, 2009). Thus, it seems unlikely that air-seeding would be due to pit membrane pore enlargement. Alternatively, the residual plastic strains observed suggest that the pit membrane may experience some structural damage when air-seeding occurs. The observation of cavitation fatigue also supports the pit membrane rupture hypothesis (Hacke *et al.*, 2001). The comparison between ε and $\bar{\varepsilon}$ opens the discussion on the point where on the membrane air-seeding occurs. If pores have a more or less similar diameter across the pit membrane area, which would be expected based on the equal thickness of angiosperm pit membranes, then air-seeding should occur mostly at the middle of the membrane where maximum strain is experienced. *SEM* analyses of pits tend to support this hypothesis (Choat *et al.*, 2004). On the contrary, if we consider some variability in pore diameter and the idea that the largest pore is randomly distributed on the pit membrane surface (Sano 2005), the mean membrane strain should be considered as a relevant parameter to evaluate air-seeding resistance. Both hypotheses are relevant and the debate will continue until the mechanisms of air-seeding will be understood.

Acknowledgment

The authors thank the electron microscopy section of Ulm University for assistance with TEM. This research was funded in part by the PitBulles project (ANR no. 2010 Blanc 171001).

Bibliography

Angeles G, Bond B, Boyer JS, Brooks JR, Burns MJ, Cavender-Bares J, Clearwater M, Cochard Hervé, Comstock J, David SD, Domec J-C, Donovan L, Ewers FW. 2004. The Cohesion-Tension Theory. *New Phytologist* **163**: 451–452.

Bauchau A, Craig JJ. 2009. Kirchhoff plate theory. *Structural Analysis*. Springer Berlin Heidelberg, 819–914.

Brodrribb TJ, Cochard H. 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* **149**: 575–84.

Choat B, Ball M, Lully J, Holtum J. 2003. Pit Membrane Porosity and Water Stress-Induced Cavitation in Four Co-Existing Dry Rainforest Tree Species. *Plant Physiology* **131**: 41–48.

Choat B, Cobb AR, Jansen S. 2008. Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New Phytologist* **177**: 608–25.

Choat B, Jansen S, Brodrribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke Uwe G., Jacobsen AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann Jarmila, Pratt RB, Sperry John S., Westoby M, Wright IJ, Zanne AE. 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752–755.

Choat B, Jansen S, Zwieniecki M a, Smets E, Holbrook NM. 2004. Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1569–75.

Choat B, Pittermann J. 2009. New insights into bordered pit structure and cavitation resistance in angiosperms and conifers. *New Phytologist* **182**: 557–560.

- Christman M, Sperry JS, Adler FR. 2009.** Testing the “rare pit” hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**: 664–674.
- Cochard H. 2002.** A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell and Environment* **25**: 815–819.
- Cochard H. 2006.** Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique* **7**: 1018–1026.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T. 2005.** Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**: 410–418.
- Hacke U G, Stiller V, Sperry J S, Pittermann J, McCulloh K. 2001.** Cavitation fatigue. Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant Physiology* **125**: 779–86.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L. 2006.** Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* **26**: 689–701.
- Herbette S, Cochard H. 2010.** Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant Physiology* **153**: 1932–9.
- Herbette S, Wortemann R, Awad H, Huc R, Cochard H, Barigah TS. 2010.** Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology* **30**: 1448–55.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A. 2009.** Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**: 409–419.
- Karnovsky M. 1965.** A formaldehyde- glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137–138.
- Lens F, Sperry John S, Christman M, Choat B, Rabaey D, Jansen S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist* **190**: 709–23.

Lens F, Tixier A, Cochard H, Sperry JS, Jansen S, Herbette S. 2013. Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies. *Current Opinion in Plant Biology*: **16**: 297-292.

Nakamura K, Wada M, Kuga S, Okano T. 2004. Poisson 's ratio of cellulose I and cellulose II. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **42**: 1206–1211.

Pammenter NW, Vander Willigen C. 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**: 589–593.

Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS. 2011. Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant, Cell & Environment* **34**: 501–13.

Plavcová L, Hacke UG. 2012. Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. *Journal of Experimental Botany* **63**: 695–709.

Sano Y. 2005. Inter and intraspecific structural variations among intervacular pit membranes as revealed by field-emission scanning electron microscopy. *American Journal of Botany* **92**: 1077–1084.

Schneider C., Rasband WS, Eliceiri K. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671–675.

Scholz A., Rabaey D., Stein A., Cochard H., Smets E., Jansen S. In press. The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology (in press)*.

Shane M, Cully M, Canny M. 2000. Architecture of Branch-root Junctions in Maize: Structure of the Connecting Xylem and the Porosity of Pit Membranes. *Annals of Botany* **85**: 613–624.

Sperry JS, Hacke UG. 2004. Analysis of circular bordered pit function. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany* **91**: 369–385.

Thomas RJ. 1972. Bordered pit aspiration in angiosperms. *Wood and Fiber* **3**: 236–237.

Tyree M T, Sperry J S. 1989a. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **40**: 19-38.

Tyree M T, Sperry J S. 1989b. Characterization and propagation of acoustic emission signals in woody plants: towards an improved acoustic emission counter. *Plant Cell and Environment* **12**: 371-382.

Tyree M T, Zimmermann MH. 2002. *Xylem structure and the ascent of sap*. 2nd Edition, Berlin: Springer.

Wheeler JK, Sperry JS, Hacke Uwe G, Hoang N. 2005. Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell and Environment* **28**: 800–812.

Zietlow DW, Griffin DC, Moore TR. 2012. The limitations on applying classical thin plate theory to thin annular plates clamped on the inner boundary. *AIP Advances* **2**: 042103–1–042103–8.

Zwieniecki M a, Secchi F. 2012. Getting variable xylem hydraulic resistance under control: interplay of structure and function. *Tree Physiology* **32**: 1431–3.

RESULTATS

CHAPITRE 2

***PRODUCTION ET CARACTERISATION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES
MODIFIES POUR LE METABOLISME DES PECTINES***

***UTILISATION DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA POUR
PROSPECTER LES BASES GENETIQUES DE LA VULNERABILITE A LA
CAVITATION***

PRODUCTION ET CARACTERISATION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES MODIFIES POUR LE METABOLISME DES PECTINES

Nous présentons l'approche de production de peupliers transgéniques modifiés pour le métabolisme des pectines. Le choix des gènes candidats, ainsi que les méthodes de transgénèse sont développés. La caractérisation de lignées transgéniques surexprimant une polygalacturonase montre une implication des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation

INTRODUCTION : CHOIX DES GENES CANDIDATS

Les pectines

Pectine méthylesterase

Endopolygalacturonase

Apiose xylose synthase

GDP-mannose 4-6 déhydratase

PRODUCTION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES

Constructions des cassettes d'expression

Transformation d'Agrobacterium tumefaciens

Transformation de Populus tremula x alba

CARACTERISATION DES LIGNEES TRANSGENIQUES

Génotypage des lignées transformées

Phénotypage des lignées transgéniques Pta4CL1 :: AnPG

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PRODUCTION ET CARACTERISATION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES MODIFIES POUR LE METABOLISME DES PECTINES

Afin de prospecter l'implication des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation, nous avons produit des peupliers transgéniques (clone INRA 717-1B4). Ce travail a été réalisé avec Anais Dusotoit, post doctorante sur le projet Pitbulles. Les constructions du travail de thèse ciblaient le métabolisme des pectines alors que celles du contrat post-doctorat ciblaient le métabolisme des hémicelluloses. Ainsi les composants spécifiques à la paroi primaire pouvaient être plus largement étudiés par cette approche gène candidat. La génération de peupliers transgéniques consiste en trois grandes étapes. Dans un premier temps les gènes candidats sont clonés dans des vecteurs d'expression puis insérés dans *Agrobacterium tumefaciens* pour permettre leur expression dans la plante. Cette étape a duré 8 mois. Ensuite, des explants sont incubés en présence des souches recombinantes pour faciliter leur transformation. Les explants transformés sont alors sélectionnés par résistance à un antibiotique, puis cultivés *in vitro* afin de régénérer des plantes entières par différentes étapes. Ces étapes de transformations et régénérations ont duré 3 mois. Les plantules obtenues ont été multipliées *in vitro* puis acclimatées en serre afin d'être génotypées et phénotypées. Les étapes de multiplication et d'acclimatation ont été réalisées sur 3 à 4 mois. Enfin, le phénotypage et génotypage des plantes acclimatées et cultivées en serre a nécessité 4 mois supplémentaires.

I INTRODUCTION : CHOIX DES GENES CANDIDATS

Le principal risque d'une approche de transgénèse réside dans le choix des gènes candidats et nous développons en introduction de ce chapitre la réflexion menée pour les sélectionner.

1) Les pectines

Le choix des pectines s'est fait en raison de résultats physiologiques suggérant leur rôle et leur présence dans les ponctuations, et aussi car ces molécules représentent une cible spécifique de la paroi primaire. Les ponctuations étant des zones de la paroi exempte de paroi secondaire, un changement dans l'expression des gènes du métabolisme des pectines, qui serait postérieur au dépôt de la paroi primaire, pourrait modifier la structure des ponctuations sans toutefois altérer les parois secondaires des vaisseaux. Au contraire, des changements dans l'expression de ces gènes au moment du dépôt de la paroi primaire pourraient avoir un effet sur les dimensions des vaisseaux qui sont déterminées durant la phase d'expansion cellulaire. Un changement des dimensions des

vaisseaux aurait par exemple un effet sur la surface de ponctuation des vaisseaux (Christman et al., 2009). Cela permettrait ainsi de tester l'effet de la structure des vaisseaux sur la vulnérabilité à la cavitation. Les choix des gènes candidats se sont portés sur des enzymes impliquées dans la modulation des liaisons calcium et bore des pectines.

Les pectines sont des molécules complexes comprenant cinq domaines de molécules liés entre eux: les homogalacturonanes (*HG*), les xylogalacturonanes (*XGA*), les apiogalacturonanes (*AGA*), les rhamnogalacturonanes II (*RG-II*), et les rhamnogalacturonanes (*RG-I*) Ces macromolécules sont structurées à partir de monosaccharides, en trois étapes: initiation de synthèse dans l'appareil de golgi, dépôt et assemblage, puis modification *in muro*. (Caffall and Mohnen, 2009).

Les pectines influencent la porosité et les propriétés mécaniques de la paroi notamment par leur niveau de méthylation et leur liaisons (Zhang and Staehelin, 1992; Carpita and Gibeaut, 1993), et nous avons vu que ces propriétés seraient déterminantes pour la vulnérabilité à la cavitation. L'approche gènes candidats s'est donc portée sur des gènes contrôlant ces méthylations et ces liaisons pectiques. Le niveau de méthylation *in muro* des pectines est contrôlé par des pectines méthylestérases (*PME*), enzymes qui libèrent les groupements méthyles et génèrent ainsi des groupements carboxyliques ionisés. L'action des *PME* affecte ainsi la répartition des charges négatives et favorise un pH pariétal acide. Ces sites carboxyliques sont des sites potentiels de fixation du calcium, formant des structures en « boîte d'œuf » qui sont des zones de jonction entre deux chaînes d'*HGA*. Les structures en boîtes d'œufs diminuent la porosité et rigidifie alors la paroi (Baron-Epel et al., 1988; Pelloux et al., 2007). Les groupements carboxyliques peuvent être des cibles pour des enzymes de dégradation telles que des endopolygalacturonases ou encore favoriser l'intervention des expansines qui augmenteraient l'extensibilité de la paroi. Le calcium avait été montré précédemment par l'équipe comme un déterminant majeur de la vulnérabilité à la cavitation (Herbette and Cochard, 2010). Le calcium pourrait influencer les propriétés de déformation de la membrane ou encore sa porosité.

Un autre élément, le bore, est aussi un agent de liaison des pectines. Il est spécifique à la paroi et il est impliqué dans sa porosité et sa stabilité (Fleischer et al., 1998). Environ 90 % du bore de la plante est stocké dans la paroi (Blevins and Lukaszewski, 1998). Cette spécificité pour la paroi permettrait de limiter les effets d'une transgénèse sur d'autres métabolismes. Le bore des parois est présent sous forme de borate engagé dans des liaisons diester entre deux chaînes de *RG-II*. Une modulation des gènes impliqués dans la fixation du bore dans la paroi aurait un effet spécifique sur les *RG-II* de la paroi primaire. Contrairement au calcium, l'implication du bore dans la vulnérabilité à la cavitation est cependant hypothétique.

Le métabolisme des pectines étant d'une grande complexité, le choix des gènes candidats est orienté sur les liaisons calcium et borate entre les domaines pectiques. Nous avons aussi fait le choix

Table 2 : Informations sur les transgènes et les promoteurs utilisés pour les cassettes d'expression.

| nom | Accession (NCBI) | Fonction | Origine de la séquence | Promoteur |
|----------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| <i>PttPME1</i> | AJ2ZZ547 | pectine methylesterase | <i>Populus tremula x tremuloides</i> | <i>Pta4CL1</i> |
| <i>AtAXS1</i> | AY442191 | apiose xylose synthase | <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>CAMV 35S</i> |
| <i>PtGMD2</i> | XM_002310816 | GDP-mannose 4-6 déhydratase | <i>Populus trichocarpa</i> | <i>CAMV 35S</i> |
| <i>AnPGII</i> | X58893 | Endopolygalacturonase | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Pta4CL1</i> |

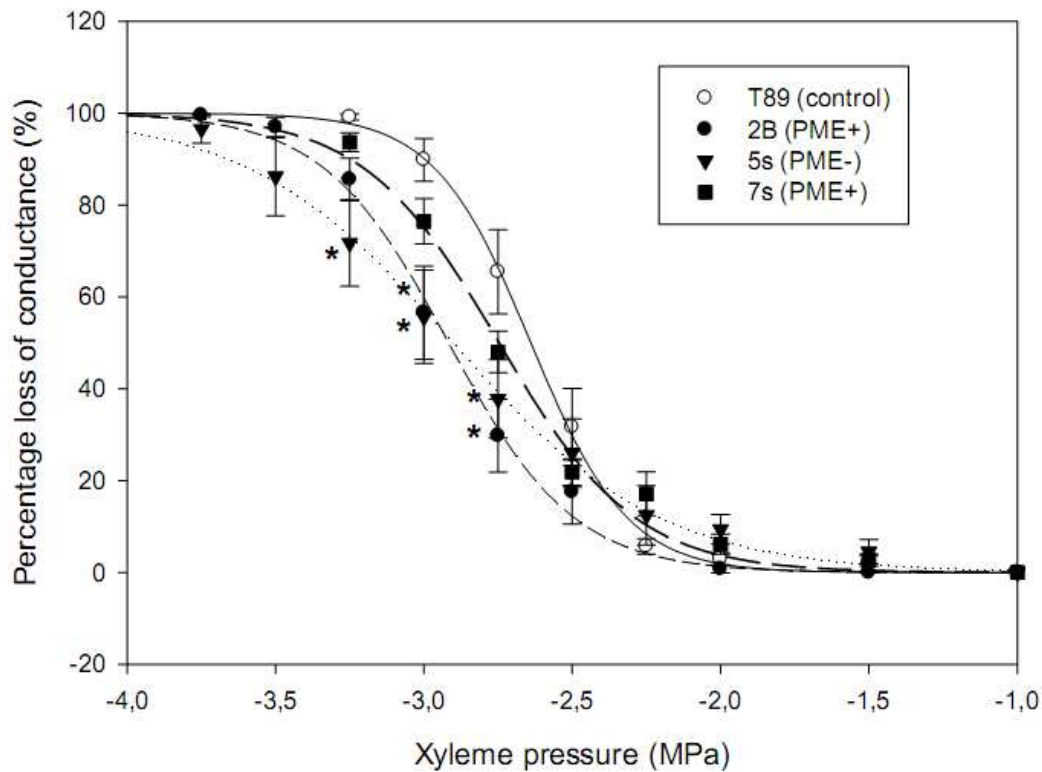


Figure 42 : Courbes de vulnérabilité à la cavitation de lignées transgéniques de peuplier modifiées pour l'expression de *PME*. Les points représentent les valeurs moyennes pour 6 à 8 plantes avec l'erreur standard qui est représentée par les barres. Pour chaque valeur de pression, une ANOVA a été réalisée pour détecter des différences significatives (*) entre les lignées transgéniques et les plantes non transformées (T89, plantes témoins). Les lignées 2B et 7s surexpriment *PttPME1* (PME+) alors que la lignée 5s la sous-exprime (PME-).

de gènes qui ne soient pas impliqués dans la structure de base de la paroi comme le sont les gènes biosynthèse de précurseur de plusieurs macromolécules ou ceux de la synthèse de la cellulose. L'analyse bibliographique que nous avons menée nous a conduit à choisir les gènes *PME1*, *AXS1*, *GMD2* et *PG*. Nous avons réalisé deux constructions surexprimant les gènes de biosynthèse *AtAXS1* et *PtGMD2* afin de prospecter le rôle du bore dans la vulnérabilité à la cavitation. Deux autres constructions surexprimant les gènes de modification des pectines *PttPME1* et *AnPG* ont été développées pour prospecter respectivement le rôle du calcium et celui des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation. (Table 2). La réflexion qui nous a menée à sélectionner chacun de ces gènes est développée ci-après.

Lors de son analyse bibliographique ciblant le métabolisme des hémicelluloses, Anais Dusotoit a choisi les gènes *AtCslA9*, *AtCslC4* et *PtaXTH* codant respectivement pour des glucomannane 4-beta mannosyltransférase, xyloglucane glycosyltransférase et une xyloglucane endotransglucosylase. Les transgènes sont exprimés sous contrôle d'un promoteur CaMV35S.

2) Pectine méthylesterase

PttPME1 est une enzyme de modification des homogalacturonanes (*HG*). Elle catalyse la déméthylesterification des *HG in muro*. Le gène *PME* code pour une pré-proprotéine. Les séquences « pré » et « pro » permettent d'orienter la protéine mature vers le réticulum endoplasmique puis l'apoplasme. Les *PME* appartiennent à une famille multigénique avec 89 et 67 gènes identifiés dans le génome de *Populus trichocarpa* et *Arabidopsis thaliana* respectivement (Micheli, 2001). Les différentes isoformes présentent des patrons d'expression variable, des substrats et des modes d'actions différents. *PttPME1* a été sélectionnée car elle avait été identifiée comme une isoforme spécifique du bois et sa fonction avait été caractérisée (Siedlecka et al., 2008).

La modification de l'expression de *PME* altère la rigidité de la paroi (Wen et al., 1999 ; Hasunuma et al, 2004 ; Bosch et al 2005), et des lignées transgéniques de peupliers surexprimant ou sous exprimant cette enzyme montrent une altération de la croissance des cellules du bois (Siedlecka et al., 2008), avec une diminution des diamètres des vaisseaux. Nous avons phénotypé ces lignées (Awad, 2011) (Figure 42) et elles se sont révélées être sensiblement plus vulnérables à la cavitation (P_{50} variant de 0.27 MPa). Néanmoins, la surexpression des *PME* modulée par le promoteur constitutif *CAMV 35S* peut avoir un effet drastique sur la structure des parois de toutes les cellules, avec notamment des effets sur les dimensions des vaisseaux et potentiellement sur tous les tissus (Capodicasa et al., 2004).. Il est donc probable que seules les lignées présentant de faibles phénotypes puissent être régénérées, expliquant une faible modification de la vulnérabilité à la cavitation. D'ailleurs, le niveau de méthylation des pectines n'était que légèrement modifié chez ces lignées transgéniques (Siedlecka et al., 2008). De plus, les variations structurales potentielles qui sont

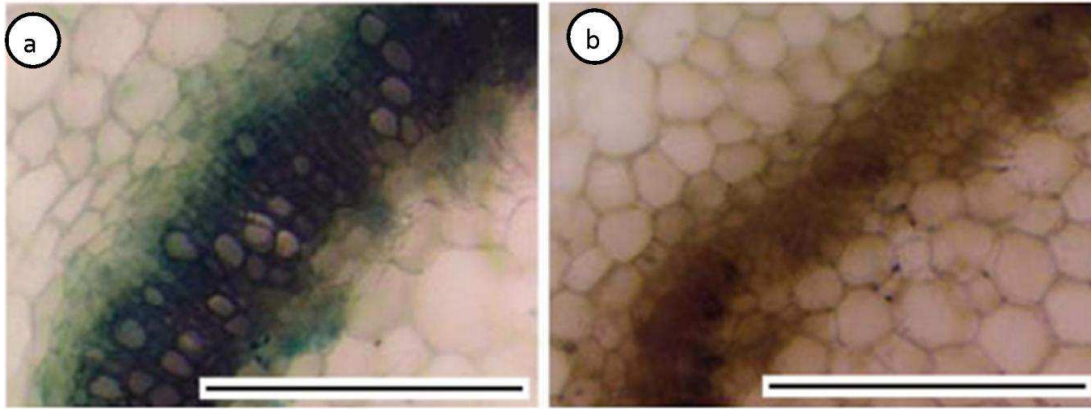


Figure 43 : Expression xylème-spécifique du promoteur Pto4CL1. Le gène rapporteur GUS est régulée par le promoteur Pto4CL1 dans des tabacs transgéniques. La réaction biochimique de la glucuronosidase a lieu dans le xylème des tabacs transgénique (a) mais pas dans les plantes sauvages (b). Echelle : 100µm. (Lu et al., 2004)

à l'origine de faibles variations de vulnérabilité à la cavitation sur ces lignées peuvent être difficilement détectables. C'est pourquoi nous avons réalisé une autre construction avec un promoteur spécifique des lignines permettant de cibler l'expression du transgène lors des étapes tardives de la xylogénèse (Lu et al, 2004). Le promoteur *Pto4CL1* régule l'expression du gène 4-Coumarate : CoA ligase qui catalyse l'activation des acide coumarique, cafféique et férulique. Ce sont des constituants des lignines retrouvées dans le xylème et une étude de son promoteur a montré une expression xylème- spécifique, à l'aide du gène rapporteur *GUS*, chez des tabacs (Figure 43) (Lu et al., 2004). Au cours de la xylogénèse, les processus de lignification interviennent après l'expansion cellulaire. Ainsi la surexpression de *PttPME1* par le promoteur *Pto4CL1* permettrait de ne pas induire de modification de la paroi primaire des vaisseaux lors de l'expansion cellulaire. L'expression du gène serait induite dans le xylème mature, où seules les parois primaires des ponctuations sont accessibles.

3) *Endopolygalacturonase*

Le promoteur *Pta4CL1* a aussi été utilisé pour contrôler l'expression d'*AnPG*, une endopolygalacturonase (*PG*) de *Aspergillus niger* (Capodicasa et al., 2004). Les *PG* catalysent la dégradation spécifique des homogalacturonanes (*HG*) et appartiennent à de larges familles multigéniques chez les plantes. L'utilisation de *PG* de mycète pathogène pour des expériences de transgénèse présente l'avantage d'être plus actives et plus efficaces que les *PG* végétales (De Lorenzo et al, 2001 ; Capodicasa, 2004). La surexpression d'*AnPG* chez le tabac induit des altérations de croissance associées à des modifications de la composition des parois cellulaires et une augmentation du nombre de cellules conductrices avec des diamètres plus faibles (Capodicasa et al., 2004). De plus, les plantes transformées présentent une sensibilité plus grande à la déshydratation que les plantes témoins (Capodicasa et al., 2004). Ces plantes transformées montrent aussi une plus faible surface foliaire (Nardini et al., 2007). Les auteurs avaient utilisé *AnPG* pour tester l'implication des *HGA* dans l'effet ionique de la sève sur la conductivité. Ils n'observent aucune différence entre les plantes surexprimant *AnPG* et les témoins. Une expression contrôlée d'*AnPG* par le promoteur *Pto4CL1* pourrait modifier la teneur en *HG* spécifiquement au niveau des ponctuations, augmenter ainsi la porosité des membranes ou altérer leurs propriétés mécaniques et les rendre plus vulnérables au germe d'air. Nous avons utilisé la construction développée par Capodicasa et al. (2004) qui présente une séquence de peptide signal d'origine végétale (*Phaseolus vulgaris*) en amont de la séquence *AnPG* permettant la sécrétion de l'enzyme dans l'apoplasme.

4) *Apiose xylose synthase*

AtAXS1 est un gène codant pour une enzyme apiose xylose synthase (AXS) chez *Arabidopsis thaliana* (O'Neill et al., 2001). L'apiose (UDP-*D*-apiose) est un résidu spécifiquement trouvé dans les rhamnogalacturonanes et représente le site unique de fixation du bore dans la paroi. Cette spécificité de fixation sur un seul sucre pour l'approche de transgénèse, permettrait de limiter les effets potentiels sur d'autres constituants de la paroi et d'agir spécifiquement sur les liaisons borates *in muro*. Les diesters formés entre le borate et les apioses établissent des liaisons entre les chaînes de RG II. Cette propriété leur confère un rôle important dans la porosité et la rigidité de la paroi et pourrait alors conditionner ces propriétés pour la ponctuation. AXS est cruciale pour la plante en dépit du peu de gènes codant cette fonction et alors que les gènes du métabolisme pariétal appartiennent généralement à de larges familles mutigéniques. Les génomes d'*Arabidopsis thaliana* et de *Populus trichocarpa* ne présentent que deux copies du gène AXS : AXS1 et AXS2. A ce jour, aucun double mutant *axs1/axs2* n'a pu être régénéré chez *Arabidopsis thaliana* (Mølhøj et al., 2003), et leur expression est constitutive. Le silencing de ces gènes chez le tabac conduit à des structures de paroi anormales et une croissance altérée (Ahn et al., 2006). Le gène AXS1 est un gène de biosynthèse de la paroi primaire qui est en place avant l'apposition de lignines dans les cellules conductrices. Une surexpression par le promoteur *Pto4Cl1* ne semble pas adaptée car les enzymes et sites de fixation de l'apiose ne seraient probablement pas accessibles à ce stade de maturation de la cellule. Le promoteur constitutif CaMV35S est donc sélectionné pour réguler l'expression du gène AXS. Le fait que la fonction du gène *AtAXS1* ait été caractérisée nous a ensuite orienté à sélectionner ce gène. De plus l'éloignement phylogénétique entre *Arabidopsis thaliana* et *Populus tremula x alba* présente un avantage pour limiter les phénomènes de silencing du transgène souvent associés à une forte homologie de séquence avec le gène endogène.

5) *GDP-mannose 4-6 déhydratase*

PtGMD2 code pour une GDP-mannose 4-6 déhydratase, enzyme impliquée dans la biosynthèse du *L*-fucose. Le *L*-fucose entre dans la composition des RG-II (O'Neill et al., 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que le mutant perte de fonction de cette enzyme de biosynthèse réduit le nombre et la stabilité des liaisons borates entre les RG-II conduisant à un phénotype de plante naine qui peut être inversé par ajout exogène de bore ou de *L*-fucose (O'Neill et al., 2001). Le résidu *L*-fucose est remplacé par du *L*-galactose dans les chaînes de RG-II. Ce remplacement conduit à une réorganisation des chaînes de pectines conduisant à la diminution des liaisons borates *in muro* bien que la composition de la paroi ne présente pas de modification hormis la déficience en *L*-fucose (Reuhs et al., 2004). *GMD* étant un gène de biosynthèse de la paroi primaire, le promoteur CaMV35S a été choisi pour réguler son expression pour les mêmes raisons

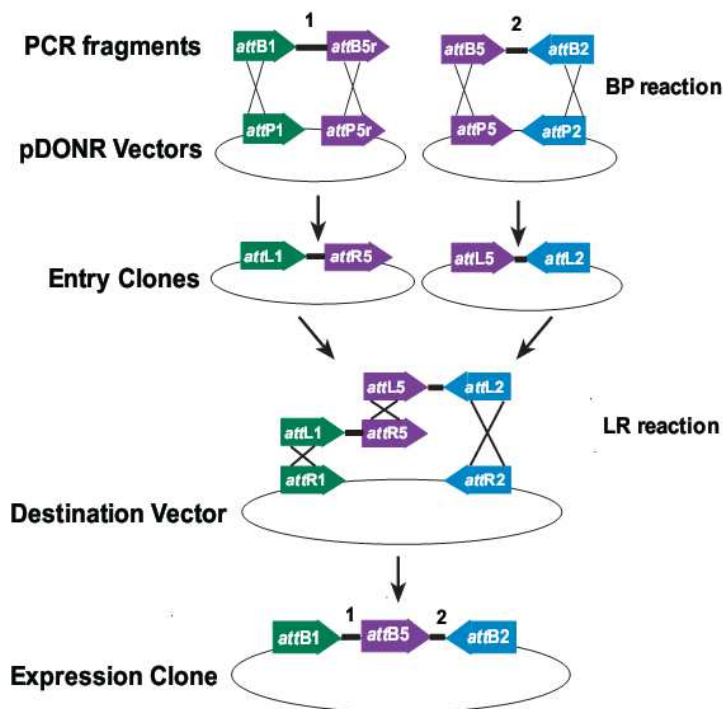


Figure 44 : Schéma du système Gateway pour la recombinaison de deux séquences dans un vecteur d'expression (pEXPR). Le clonage est basé sur deux réactions de recombinaison successives. La réaction de recombinaison BP clone la séquence d'intérêt porteuse des sites *attB* dans un vecteur d'entrée (pENTR) porteur des sites *attP*. Le clone d'entrée résultant de la réaction BP constitue le point de départ de la seconde recombinaison, la réaction LR. La réaction de recombinaison LR transfère les deux séquences porteuses des sites *attL* au niveau des sites *attR* du clone de destination (pDEST).

Table 3 : propriétés et séquences des amorces utilisées pour cloner les gènes candidats.

| Séquence | Taille amplifiat (nt) | T _m (°C) | Séquence amorce | Matrice |
|----------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|------------|
| <i>PttPME1</i> | 1849 | 62 | FW-> CTTTTCTCTCCTCAAATGGC | ADNc |
| | | | RV-> TGAAAACACGAGCTCACTG | (feuille) |
| <i>AtAXS1</i> | 1170 | 62 | FW-> ATGGCGAATGGAGCTAATAGAG | ADNc |
| | | | RV-> TTAGGAAGCCACTGGTTTGGATG | (plantule) |
| <i>PtGMD2</i> | 1135 | 62 | FW-> CAACTCCATCTGACCGTCCATC | ADNg |
| | | | RV-> TCAGTTC AAGTTGCTGCTG | |
| <i>AnPG2</i> | 1136 | 62 | FW -> ATGACTCAATTCAATATCCCAG | ADNc |
| | | | RV-> TAACAAGAGGCCACCGAA | |
| <i>Pta4CL1</i> | 1136 | 57 | FW-> GACGGTGGCATGAACACAAAGC | ADNg |
| | | | RV -> TGCGAGTTTTAGGTGCTCT | |

explicitées pour le gène *AtAXS1*. Le gène *PtGMD2* présente de fortes homologues de séquence avec le gène *AtGMD2*. Il est sélectionné car la faible distance phylogénétique entre *Populus trichocarpa* et *Populus tremula x alba* pourrait augmenter la probabilité de silencing des gènes GMD endogène et générer des phénotypes similaires aux mutants « perte de fonction » d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, les différents événements de transformation pourraient conduire à des lignées surexprimant le gène *GMD* ou présentant du silencing du gène endogène.

II PRODUCTION DE PEUPLIERS TRANSGENIQUES

1) Constructions des cassettes d'expression

Les séquences codantes des gènes candidats sont clonées dans des vecteurs du système Gateway (Invitrogen) (Figure 44). La technologie Gateway est basée sur les propriétés du bactériophage λ lors d'infections de bactéries. Pour se reproduire, le phage doit s'introduire dans une bactérie où il recrutera la machinerie de l'hôte pour synthétiser les molécules nécessaires à sa duplication. L'insertion de l'ADN du phage λ dans le chromosome bactérien a lieu par recombinaison en des sites spécifiques. L'ADN du phage λ recombine dans le chromosome en utilisant le site spécifique du phage appelé *attP* (« attachement Phage »), et le site spécifique du chromosome bactérien appelé *attB* (« attachement Bactérie »). Quand l'ADN du phage λ est inséré dans le chromosome, il est lié par des sites *attL* et *attR* qui sont des hybrides des sites *attB/attP*. Cette insertion est dite recombinaison site-spécifique et fait intervenir des enzymes spécifiques (Roure, 2007). La technologie Gateway a adapté les propriétés de recombinaison site-spécifique du phage λ pour le clonage moléculaire par recombinaison *in vitro*. Cette technique est plus pratique et rapide que les techniques de clonage par restriction classiquement utilisées. Elle permet notamment de s'affranchir des étapes de restriction-ligation obligatoires lors d'un clonage classique. L'insertion d'une séquence d'ADN est spécifique et directionnelle, le moyen de sélection est rapide, et il est facile d'obtenir différents plasmides d'expression à partir d'un seul plasmide d'entrée.

Le gène *PttPME1* a une longueur de 2149 nucléotides (nt) et sa séquence codante a une longueur de 1740 nt. La séquence codante de *PttPME1* est amplifiée à partir d'ADN_c de feuille de *Populus tremula x tremuloïdes*. La séquence *AtAXS1* est amplifiée à partir d'ADN_c de plantule d'*Arabidopsis thaliana*. La séquence *PtGMD2* est amplifiée à partir d'ADN_g de feuille de *Populus trichocarpa* Nisqualy car le gène n'a pas d'intron.

La séquence d'*AnPGII* est amplifiée à partir de la construction réalisée par Capodicasa et al. (2004). Le promoteur *Pta4CL1*, homologue de *Pto4CL1* est amplifié à partir d'ADN_g de feuille de *Populus tremula x alba*. Afin de vérifier l'expression xylème spécifique du promoteur *Pta4CL1*, une construction avec les gènes rapporteurs *GUS* et *GFP* est réalisée. Les séquences codantes sont

Table 4 : séquence des sites de recombinaison attB1 disposés en terminaison 5' des amorces utilisées pour cloner les gènes candidats.

| Code | séquence du site de recombinaison |
|---------------|-----------------------------------|
| <i>attB1</i> | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT |
| <i>attB2</i> | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA |
| <i>attB5r</i> | GGGGACAACTTTTGTATACAAAAGTTGT |
| <i>attB5</i> | GGGGACAACTTTGTATACAAAAGTTG |

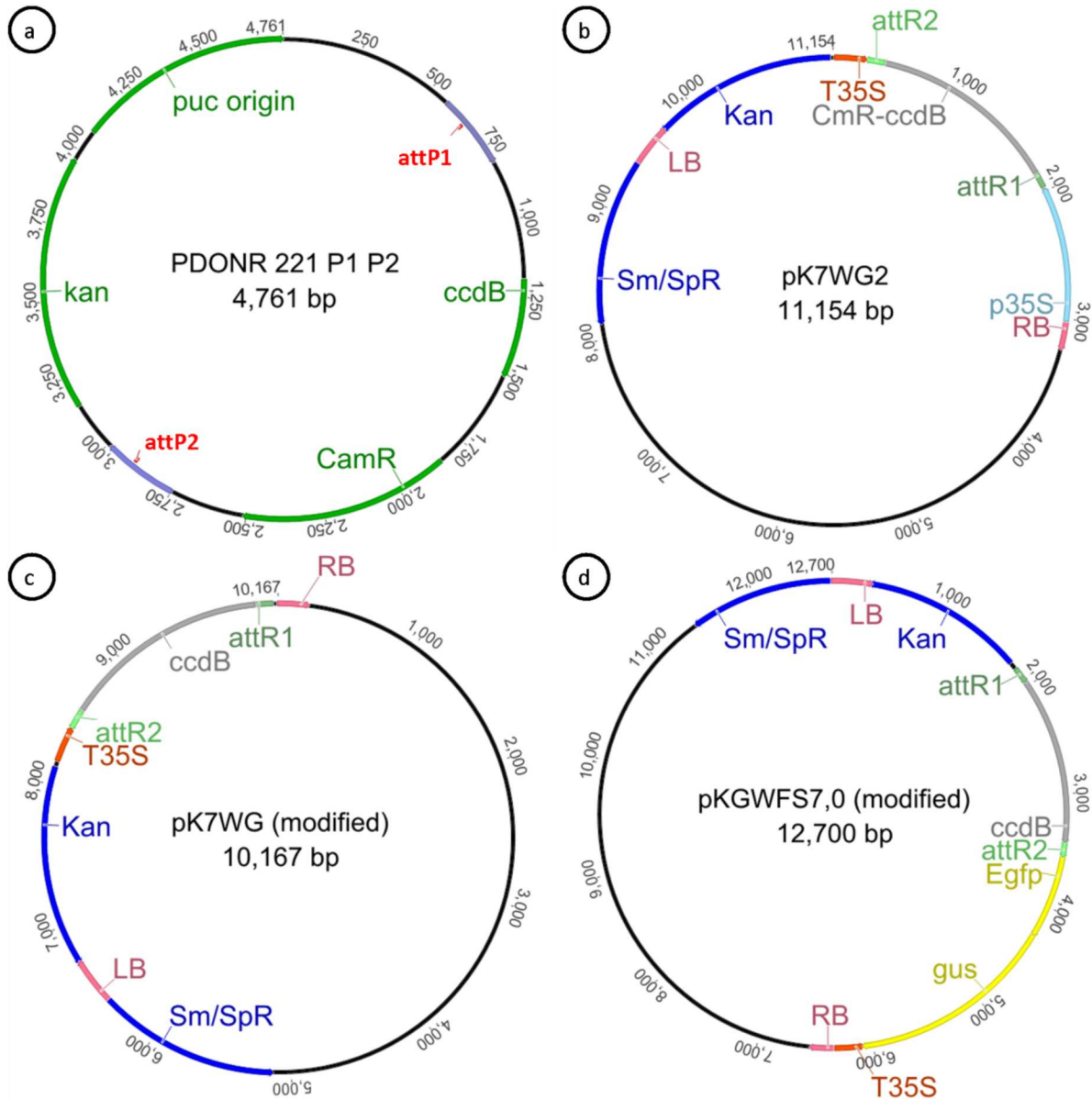


Figure 45 : carte des vecteurs pDONR 221 P1-P2 (vecteur donneur), pK7WG, pK7WG2 et pKGWFS7 (vecteurs de destination) utilisés pour le clonage des gènes d'intérêt et la transgénèse de peuplier. Puc origin : origine de répllication procaryotique ; Kan : gène de résistance à la kanamycine, Sm/SpR : gène de résistance à la spectinomycine, CamR : gène de résistance au chloramphénicol, attP : sites de recombinaison BP, attR : sites de recombinaison LR, ccdB : inhibiteur de la gyrase A462, p35S : promoteur CAMV 35S, T35S : terminateur CAMV 35S, LB : bordure gauche, RB : bordure droite, GUS : gène rapporteur β -glucuronidase, Egfp : gène rapporteur green fluorescent protein. D'après Karimi et al. (2002).

amplifiées par des amorces complémentaires des régions 3' et 5' (Table 3). Les séquences spécifiques des amorces des gènes d'intérêts sont flanquées en 5' de sites de recombinaisons (Table 4) :

-le site **attB1** est ajouté en terminaison 5' des amorces sens des séquences *Pta4CL1*, *PtGMD2* et *AtAXS1*,

- le site **attB2** est ajouté en terminaison 5' des amorces antisens des séquences *PtGMD2*, *AtAXS1*, *PttPME1* et *AnPGII*,

-le site **attB5r** est ajouté en terminaison 5' de l'amorce antisens de la séquence *Pta4CL1*,

-le site **attB5** est ajouté en terminaison 5' des amorces sens des séquences *PttPME1* et *AnPGII*.

Ces différents sites de recombinaison permettent de combiner les séquences de gènes d'intérêts à différents promoteurs. Les produits PCR sont purifiés avant de réaliser les réactions de recombinaison. Cette purification est réalisée au polyéthylène glycol (PEG) selon les instructions du fournisseur du système Gateway.

Le clonage est basé sur deux réactions de recombinaison successives (Figure 44). La première est la réaction BP et permet d'obtenir un « clone d'entrée » (pENTR) contenant la séquence d'intérêt. Ce dernier constitue le point de départ de la seconde recombinaison, la réaction LR, qui permet de transférer la séquence d'intérêt dans la construction finale, le vecteur d'expression (pEXPR) (Figure 44). La réaction BP recombine la séquence d'intérêt amplifiée par PCR présentant des sites attB, avec un plasmide donneur (pDONR) portant les sites attP (Figure 45). Au cours de la recombinaison il y a un échange des fragments d'ADN situés entre les sites de recombinaison. Ainsi, le clone d'entrée (pENTR) résultant de la recombinaison porte des sites attL (hybrides de attB et attP) en 5' et en 3' de la séquence d'intérêt (Figure 44). Les séquences *PtGMD2*, *Pta4CL1* et *AtAXS1* porteuses des sites attB1 et attB2 sont recombinaisonnées avec un plasmide pDONR 221 P1-P2 porteur des sites attP1 et attP2 (Figure 45). Le promoteur *Pta4CL1* porteur des sites attB1 et attB5r est recombinaisonné avec un vecteur pDONR 221 P1-P5r et les séquences *PttPME1* et *AnPGII* porteuses des sites attB5 et attB2 sont recombinaisonnées avec un vecteur pDONR 221 P5-P2. Les vecteurs pENTR obtenus sont résumés en figure 46.

Des bactéries *E. coli* (One Shot[®] Mach1[™] T1^R) vont ensuite être transformées par choc thermique avec le produit de recombinaison puis être cultivées sur milieu sélectif selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide pDONR porte trois gènes de sélection :

-le gène de résistance à l'antibiotique kanamycine codant une néomycine phosphotransférase permet de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide.

-le gène CmR («Chloramphénicol Résistance») est un gène de résistance au chloramphénicol, il permet de sélectionner les bactéries ayant le plasmide non recombinaisonné. Cela permet de produire le vecteur par culture bactérienne.

-le gène *ccdB*, code pour une protéine qui bloque l'action d'une gyrase (*gyrA462*). La gyrase est une



Figure 46 : Schéma des plasmides pENTR après recombinaison BP. Les séquences *PtGMD2*, *AtAXS1*, *PttPME1*, *ANPG* et le promoteur *Pta4CL1* sont clonées par recombinaison des sites attB avec les sites attP des vecteurs pDONR. Les sites resultants de la recombinaison BP sont des sites attL. Kan : gène de résistance à l'antibiotique kanamycine, Puc : origine de réplication procaryotique

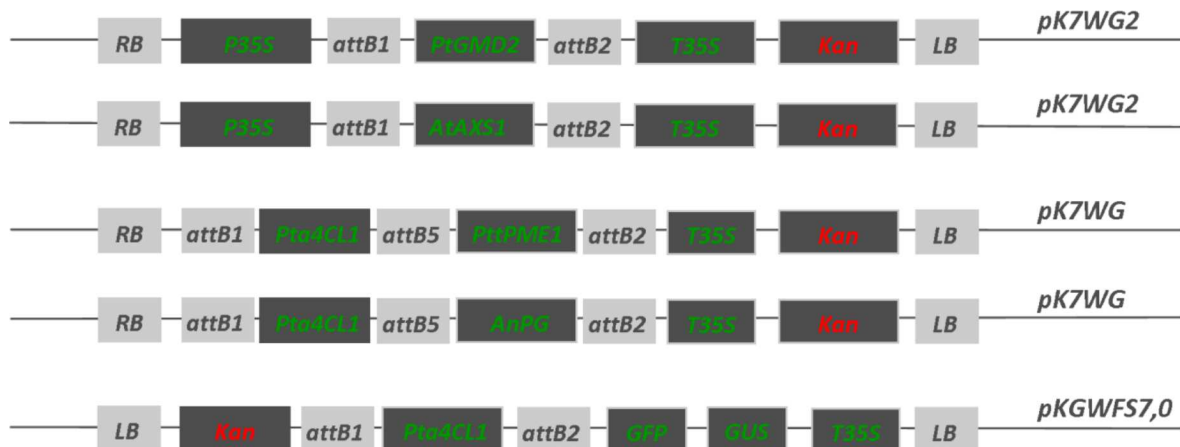


Figure 47 : Schéma des cassettes d'expression des séquences *PtGMD2*, *AtAXS1*, *PttPME1*, *ANPG* et *GUS* après recombinaison LR. les plasmides pK7WG2, pK7WG et PKGWFS7,0 porteurs des transgènes recombinés représentent les vecteurs de destination. Les constructions portées par les pDEST sont intégrées dans le génome végétal. Les cassettes intégrées sont délimitées par les bordures gauches et droites (LB, RB). Elles présentent les transgènes, un promoteur (P35S ou *Pta4CL1*), un terminateur (T35S), un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine (Kan) et les sites de recombinaisons utilisés pour le clonage (attB1, attB2 et attB5).

protéine indispensable à la lecture et la réplication de l'ADN. Ainsi en présence de la protéine *ccdB*, la souche bactérienne choisie ne peut pas répliquer son ADN. Lors de la recombinaison, le gène *ccdB* est remplacé par le gène d'intérêt. Les bactéries se développant sur milieu enrichi en kanamycine ont donc intégré un plasmide ayant subi une recombinaison. Une fois les bactéries criblées sur boîte de pétri par milieu sélectif, l'intégration du gène d'intérêt est vérifiée sur colonie bactérienne par PCR, l'ADN plasmidique (ADN_p) est extrait et purifié selon les protocoles décrits en annexe 1 et 9, et le gène d'intérêt est séquencé. Si l'insertion du gène d'intérêt est validée, une réaction LR est réalisée avec le pENTR.

La réaction LR recombine le vecteur d'entrée portant la séquence d'intérêt flanquée des sites attL (Figure 46) et un vecteur de destination (pDEST) portant une cassette Gateway flanquée des sites attR (Figure 45). Au cours de la recombinaison, la séquence d'intérêt est transférée du vecteur d'entrée sur le vecteur de destination, générant un vecteur d'expression (pEXPR) porteur de la construction. Le vecteur d'expression porte en 5' et en 3' de la séquence d'intérêt les sites attB (hybrides des sites attL et attR) (Figure 47). Les sites attB peuvent, à leur tour, être utilisés pour d'autres recombinaisons avec les sites attP :

-le vecteur **pENTR 221 L1-L2** porteur des séquences *PtGMD2* ou *AtAXS1* est mis en présence du vecteur de destination pK7WG2 porteur des sites attR1 et attR2 afin d'insérer les séquences en position 3' du promoteur CAMV 35S (Karimi et al., 2002),

-les vecteurs **pENTR 221 L1-L5r** porteur du promoteur *Pta4CL1* et **pENTR 221 L5-L2** porteur des séquences *PttPME1* ou *AnPGII* sont mis en présence du vecteur pK7WG (Karimi et al., 2002).

Les sites attL5r et attL5 sont recombinaisonnés entre eux, associant ainsi le promoteur *Pta4CL1* en position 5' de la séquence *PttPME1* ou *AnPGII* alors que les sites attL1 et attL2 du pDONR recombinaisonnent avec les sites attR1 et attR2 du vecteur de destination. Le site attL5r et le site attL5 sont recombinaisonnés entre eux, associant ainsi le promoteur *Pta4CL1* en position 5' de la séquence *PttPME1* ou *AnPGII* alors que les sites attL1 et attL2 des pDONR recombinaisonnent avec les sites attR1 et attR2 du vecteur de destination. Afin de valider la fonction du promoteur, le vecteur pENTR 221 L1-L2 porteur de *Pta4CL1* est recombinaisonné avec le vecteur de destination pKGWFS7 porteur des sites attR1 et attR2 en amont des gènes rapporteurs GUS et GFP (Karimi et al., 2002).

Les vecteurs pK7WG, pK7WG2 et pKGWFS7 présentent un gène de résistance à la spectinomycine. Ce gène permet de sélectionner les bactéries transformées sur milieu sélectif. Les vecteurs d'expression présentent une cassette d'expression bordée de deux régions : les bordures gauche et droite (LB et RB). Ces bordures délimitent la région qui est intégrée dans le génome de la plante (Tzfira et al., 2004). La cassette d'expression bordée par LB et RB présente un gène de résistance à la kanamycine, les séquences recombinaisonnées du promoteur et des gènes candidats, et un terminateur de transcription 35S (Figure 47). Le gène de résistance à la kanamycine permettra de

sélectionner les cellules des explants de peuplier transformées.

2) Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* est transformée avec les vecteurs d'expression par électroporation (Lepié et al., 1992). Pour cela, elles sont préalablement cultivées dans 300 mL de LB liquide et cultivées sous agitation à 28 °C jusqu'à une D.O à 600 nm de 0.5. Les agrobactéries sont refroidies dans la glace et récupérées lors d'une centrifugation à 1000 g à 4 °C pendant 10 min. Elles sont lavées trois fois dans 10 mL d'une solution de HEPES 1 mM (pH7), une fois dans 10 mL d'une solution de glycérol à 10 % (p/v) et reprise dans 3 mL de glycérol à 10 % (p/v). Les agrobactéries sont conservées en aliquots de 0.2 mL à -80°C. Lors de l'électroporation, 200 ng de vecteur d'expression sont ajoutés à l'aliquot préalablement décongelé dans la glace. La suspension est placée dans une cuvette à électroporation avec des électrodes distantes de 0.2 cm. Une décharge électrique de 2800 V est appliquée avec l'électroporateur EC100 (EC Apparatus Corporation). Les agrobactéries sont ensuite cultivées dans 0.8 mL de milieu LB liquide à 28 °C pendant 1 H. Des aliquots à différentes concentrations sont étalés sur un milieu LB contenant 20 mg.L⁻¹ de rifampycine, 50 mg.L⁻¹ de gentamycine et 50 mg.L⁻¹ de spectinomycine. Après une incubation de 48H, la transformation de la bactérie est vérifiée par PCR sur colonie.

3) Transformation de *Populus tremula x alba*

La transformation de *Populus tremula x alba* (clone INRA 717 -1B4) est réalisée par une succession de quatre étapes : pré-culture, co-culture, décontamination, puis sélection. Le protocole de transformation génétique du peuplier utilisé est celui de Lepié et al., (1992). Le travail est réalisé sous une hotte à flux laminaire horizontal sous conditions stériles. L'étape de pré-culture consiste en la préparation de *Agrobacterium tumefaciens*, et de *Populus tremula x alba* pour favoriser l'infection. Cent µl de milieu de culture LB de la souche *Agrobacterium tumefaciens* transformante sont étalés sur milieu LB contenant 20 mg.L⁻¹ de rifampycine, 50 mg.L⁻¹ de gentamycine et 50 mg.L⁻¹ de spectinomycine. Deux boîtes par construction sont cultivées pendant 48 H à 27 °C. En parallèle, des entre-nœuds de 0.8 à 1 cm de vitro-plants de peupliers âgés de 60 à 90 jours sont prélevés à raison de 40 entre-nœuds par construction. Les entre-nœuds prélevés sont fendus sur la moitié de leur longueur et déposés sur un milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) (Annexe 6) modifié et additionné d'une cytokinine et d'une auxine synthétiques (ANA 10 µM + 2ip 5 µM) pour 48 H à l'obscurité et à 24 °C.

Les agrobactéries sont prélevées et mises en suspension dans du milieu MS30 liquide (milieu MS avec une concentration de saccharose de 30 g.L⁻¹). La suspension est diluée jusqu'à atteindre une D.O à 660 nm de 0.3. Les explants sont ajoutés aux bactéries en solution à raison de 40 explants pour

Table 5 : Récapitulatif du criblage des produits de transformation

| Constructions | Nombre de lignées régénérées | Nombre de lignées transformées | Nombre de lignées présentant une surexpression |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|
| <i>Pta4CL1 :: PttPME1</i> | 2 | 1 | Non testé |
| <i>CAMV35S :: AtAXS1</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pta4CL1 :: GUS</i> | 4 | 3 | Non testé |
| <i>CAMV35S :: PtGMD2</i> | 0 | - | 0 |
| <i>Pta4CL1 :: AnPG</i> | 12 | 6 | 6 |
| <i>CAMV35S :: AtCslA9</i> | 11 | 11 | 11 |
| <i>CAMV35S :: AtCslC4</i> | 5 | 5 | 5 |
| <i>CAMV35S :: PtaXTH</i> | 10 | 10 | 8 |

80 mL de MS30 liquide puis le mélange est agité à 125 tour.min⁻¹ pendant 18 H à 24 °C à l'obscurité. Ensuite, les explants sont récupérés et placés en milieu de pré-culture MS modifié à raison de 20 explants par boîte pour 48 H à l'obscurité à 24 °C. Cette étape permet la transformation des cellules des explants par les agrobactéries.

L'étape de décontamination permet d'éliminer les agrobactéries après infection et d'induire la multiplication cellulaire des explants de peupliers. Les explants sont lavés dans un erlenmeyer stérile avec 100 mL d'eau distillée, 5 fois pendant 5 minutes. Cette étape élimine l'essentiel des bactéries. Puis les explants sont placés sur milieu MS modifié et additionné de céfotaxime (250 g. L⁻¹) et ticarcilline (80 mg. L⁻¹) pour 15 jours à l'obscurité à 24 °C. Cette étape permet d'éliminer les agrobactéries restantes et favorise la callogénèse des explants.

Les explants sont déposés sur le même milieu qui est utilisé pour leur décontamination, additionné de kanamycine (50 mg.L⁻¹) pour sélectionner les explants transformés, et ils sont cultivés pour 15 jours à 24 °C à la lumière. Cette étape favorise aussi la callogénèse. Le passage à la lumière induit les premiers jours une légère anthocyanose. Le milieu est renouvelé tous les 15 jours jusqu'à l'apparition de cals verts sur les explants. Les premiers cals verts apparaissent à partir de 20 jours. Il est important de faire une boîte témoin sans kanamycine contenant des explants non transformés. Quand les cals verts atteignent un diamètre de 2 mm, ils sont excisés de leur explant et transférés sur un milieu MS enrichi en saccharose (30 g.L⁻¹) additionné de céfotaxime (250 g. L⁻¹), ticarcilline (80 mg. L⁻¹), et kanamycine (50 mg.L⁻¹) ainsi que de TDZ (thiadiazuron, 0.1 µM) pour maintenir une pression de sélection et favoriser la formation de bourgeons à partir de 15 jours. Le milieu de culture est renouvelé tous les 15 jours et les cals sont numérotés pour les suivre. Plusieurs bourgeons peuvent être régénérés à partir d'un cal X ; ils sont donc affectés d'un numéro Y incluant celui du cal d'origine (X.Y) pour assurer leur suivi. Quand les bourgeons s'allongent en pousse, ils sont repiqués puis multipliés en tube sur un milieu MS1/2 (annexe 6) (Murashige and Skoog, 1962). Le milieu favorise l'enracinement et l'élongation des vitro-plants. La régénération d'un vitro plant a une durée variable de 1 à 2 mois. Suite à des problèmes de contamination fongique, aucune lignée avec la construction *CAMV 35S :: AtAXS1* n'a été obtenue. Les lignées *CAMV35S :: PtGMD2* forment des cals verts qui ne se différencient pas et ne présenteront ainsi aucune régénération. Ce travail a permis d'obtenir (Table 5) :

-2 lignées *Pto4CL1 :: PttPME1*

-4 lignées *Pto4CL1 :: GUS*

-12 lignées *Pto4CL1 :: AnPG*

-11 lignées *CAMV35S :: AtCsIA9*

-5 lignées *CAMV35S :: AtCsIC4*

-10 lignées *CAMV35S :: PtaXTH*

Table 6 : propriétés et séquences des amorces utilisées pour l'analyse d'expression des transgènes. UBC : Ubiquitine, EF1 α : facteur d'élongation de traduction α , UP : protéine de fonction inconnue.

| Constructions | Taille amplifiat (nt) | T _m (°C) | Séquence amorce |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------|---|
| <i>Pta4CL1 :: AnPG</i> | 151 | 62 | FW<-ATGACTCAATTCAATATCCCAG RV<-AGTAGAGCATTTGCGCTTGC |
| <i>CAMV35S :: AtCslA9</i> | 234 | 60 | FW<-TGGAGTGTAGCAGGTGGGCGA RV<-CCAGCGAGCTTGAACAAGAGCA |
| <i>CAMV35S :: AtCslC4</i> | 162 | 60 | FW<-CCGAAGCCGAGCTTCCGTTGT RV<- ACAGCCCGGAGATCATGGCG |
| <i>CAMV35S :: PtaXTH</i> | 161 | 60 | FW<-TGGGATGCATCGTCGTGGGC RV<-CCACCGGAGCCGGATGGAGA |
| Gènes de référence | | | |
| <i>PtaUBC</i> | 146 | 60 | FW-> GGGTCCAGCTTCTTGCAGTC RV-> CCCGGCTCTAACCATATCCA |
| <i>PtaEF1α</i> | 381 | 60 | FW<-ACAACACTAGGTACTACTGCACTGTC RV<-TTGGTGGACCTCTCGATCATG |
| <i>PtaUP2</i> | 200 | 62 | FW<-TATCGTCTTGTGACAATTTTTAG RV<-TCATTAGCGCCAGGACTTCC |

Après 3 mois, les vitroplants sont multipliés par bouturage. Puis des nouveaux vitro-plants d'environ 4 cm sont ensuite graduellement acclimatés en serre en vue de leur génotypage et leur phénotypage.

III CARACTERISATION DES LIGNEES TRANSGENIQUES

1) *Génotypage des lignées transformées*

a) Matériel et Méthodes

L'ADN des vitro plants est extrait selon le protocole décrit en annexe 7. Des PCR avec les amorces spécifiques utilisées pour cloner des séquences insérées (Table 3) sont réalisées afin de vérifier l'insertion des transgènes .

Des peupliers acclimatés en serre sont exploités pour le génotypage. Une plante par lignée est acclimatée afin d'analyser le niveau d'expression de leur transgène. Les ARN sont extraits à partir de feuilles de plantes âgées de 1 mois pour les lignées issues des constructions *35S :: AtCsIA9*, *35S :: AtCsIC4* et *35S :: PtaXTH*. Les ARN sont extraits à partir de segments de tiges d'arbre âgés de deux mois pour les lignées issues des constructions *Pta4CL1 :: AnPGII*, *Pta4CL1 :: GUS* et *Pta4CL1 :: PttPME1*. Ce délai d'un mois supplémentaire permet d'obtenir des segments de tige présentant un bois développé pour analyser l'expression des transgènes modulés par le promoteur Pta4CL1. Les extractions d'ARN et la production d'ADN_c sont réalisées selon les protocoles décrits en annexes 2 et 3. Des PCR sont ensuite réalisées afin de vérifier l'expression des transgènes. Le niveau d'expression des transgènes est évalué qualitativement par PCR puis quantitativement par PCR quantitative (qPCR) selon les protocoles décrits en annexes 4 et 5 avec des amorces spécifiques de la région interne des transgènes (Table 6). Les niveaux d'expression des transgènes sont comparés selon l'équation :

$$\frac{1}{2^{\Delta CT}}$$

avec ΔCT la différence entre cycles seuils du gène de référence endogène et du transgène. Les niveaux d'expression sont comparés à une plante non transformée. Les gènes de référence endogènes sont *PtaUBC*, *PtaEF1 α* et *PtaUP2* (Table 6).

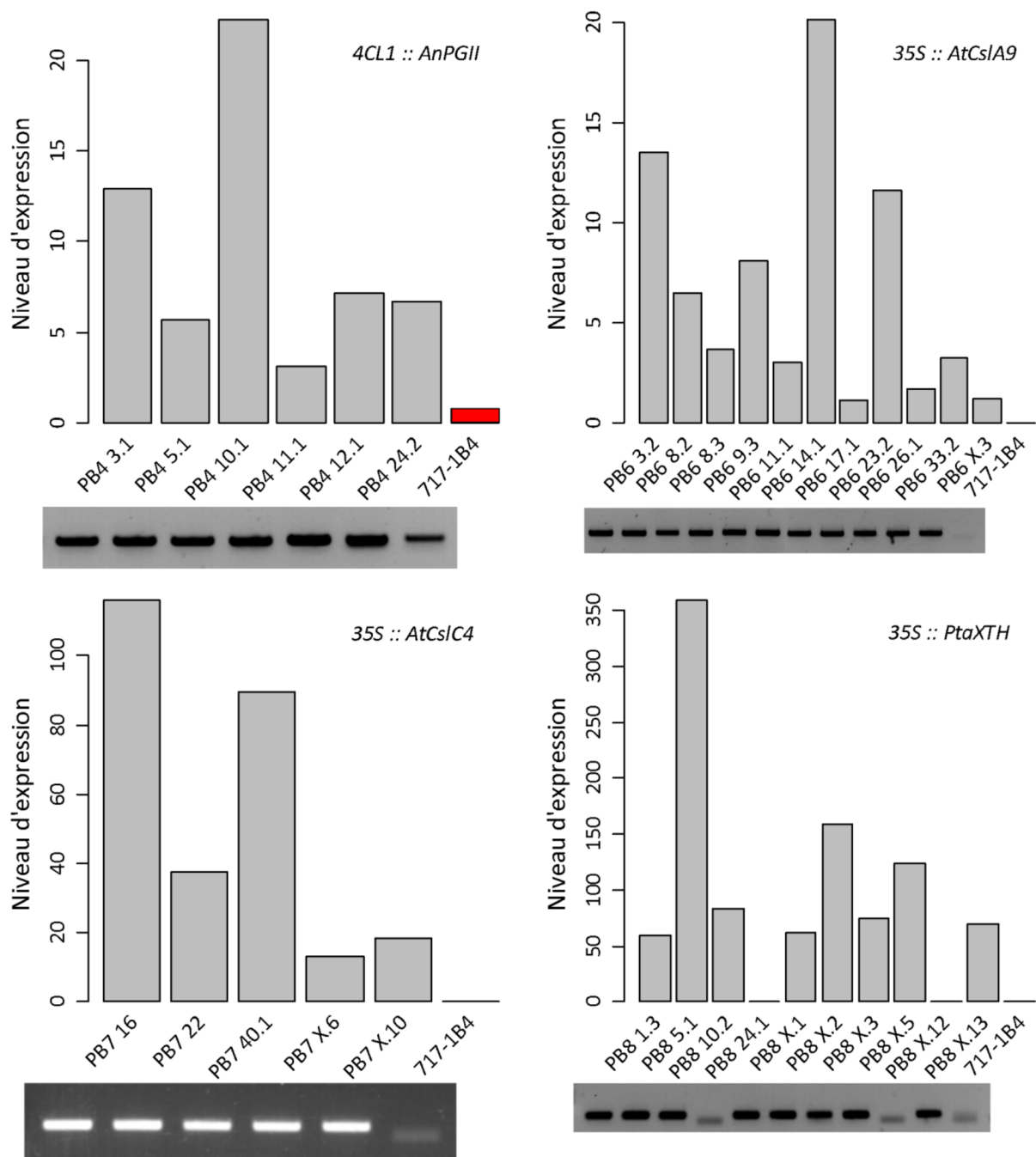


Figure 48 : Analyse par RT-PCR de l'expression des transgènes *AnPGII*, *AtCslA9*, *AtCslC4* et *PtaXTH* dans les lignées transformées de *Populus tremula x alba*. Les ARN sont extraits à partir de tiges pour les lignées *4CL1 :: AnPG* et à partir de feuilles pour les lignées *35S :: AtCslA9*, *35S :: AtCslC4* et *35S :: PtaXTH*. L'expression des transgènes est vérifiée qualitativement par PCR et le niveau d'expression des transgènes est évalué par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques des inserts (Table 6). Les niveaux d'expression dans les lignées transformées et ceux de la lignée 717-1B4 non transformée.

sont calculés selon l'équation $\frac{1}{2^{\Delta CT}}$

a) Résultats

Les expériences de génotypages permettent de valider la transformation des plantes régénérées et d'évaluer le niveau d'expression des transgènes insérés (Figure 48).

Toutes les lignées régénérées les lignées 24.1 et X.12 de la construction 35S :: *PtaXTH*. Pour AtCslA9, les lignées 3.2 et 14.1 présentent les plus forts niveaux d'expression alors que les lignées 17.1 et X.3 présentent les plus faibles niveaux d'expression. Pour le transgène AtCslC4, les lignées 16 et 40.1 présentent les plus forts niveaux d'expression et les lignées X.6 et X.10 les plus faibles. Pour le transgène *PtaXTH* Les lignées 5.1 et X.2 présentent les plus forts niveaux d'expression et les lignées X.3 et X.13 les plus faibles. Une amplification non spécifique pour le transgène *AnPGII* est observée dans la plante non transformée. Toutefois, les résultats de qPCR montrent que la quantité relative d'ADN_c amplifiée est nettement supérieure chez les plantes transformées. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que le promoteur *Pto4CL1* induit bien une surexpression du transgène dans les plantes transformées plus ou moins importante selon les lignées. Les lignées présentant les niveaux d'expression les plus importants sont les lignées 3.1 et 10.1 et les lignées 3.5 et 11.1 présentent les niveaux d'expression les plus faibles (Figure 48).

2) **Phénotypage des lignées transgéniques *Pta4CL1* :: *AnPG***

En raison de limites de temps et d'espaces de culture, une seule construction a été phénotypée. Nous avons choisi les lignées *Pta4CL1* :: *AnPGII* car une mutation de ce gène chez *Arabidopsis thaliana* présentait une diminution de la vulnérabilité à la cavitation et une augmentation de conductivité. De plus, le gène *AnPG* permettait de prospecter plus largement le rôle des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation que des gènes spécifiques de certaines liaisons pectiques.

a) Matériels et méthodes

Les lignées *Pta4CL1* :: *AnPGII* sont acclimatées avec des plantes non transformées en serre, avec un régime de photopériode de 18 H jour/ 6 H nuit, une température de 20 °C, une intensité lumineuse d'environ 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et une humidité relative de 50-60 %. A l'issue d'une période d'acclimatation en serre de 1 mois, durant laquelle l'humidité relative de l'air est graduellement diminuée, les plantes sont installées dans des pots de 10 L avec une teneur en eau maximale. Leurs croissances en hauteur et en diamètre sont évaluées par des mesures toutes les semaines pendant deux mois. Après 2 mois, les plantes atteignent une taille moyenne de 158 cm (\pm 14 cm SD) et un diamètre de tige au collet de 13.3 mm (\pm 2.0 mm SD). Les potentiels foliaires de base et minimum sont mesurés en fin d'expérience à l'aide d'une chambre à pression. Le potentiel de base est mesuré

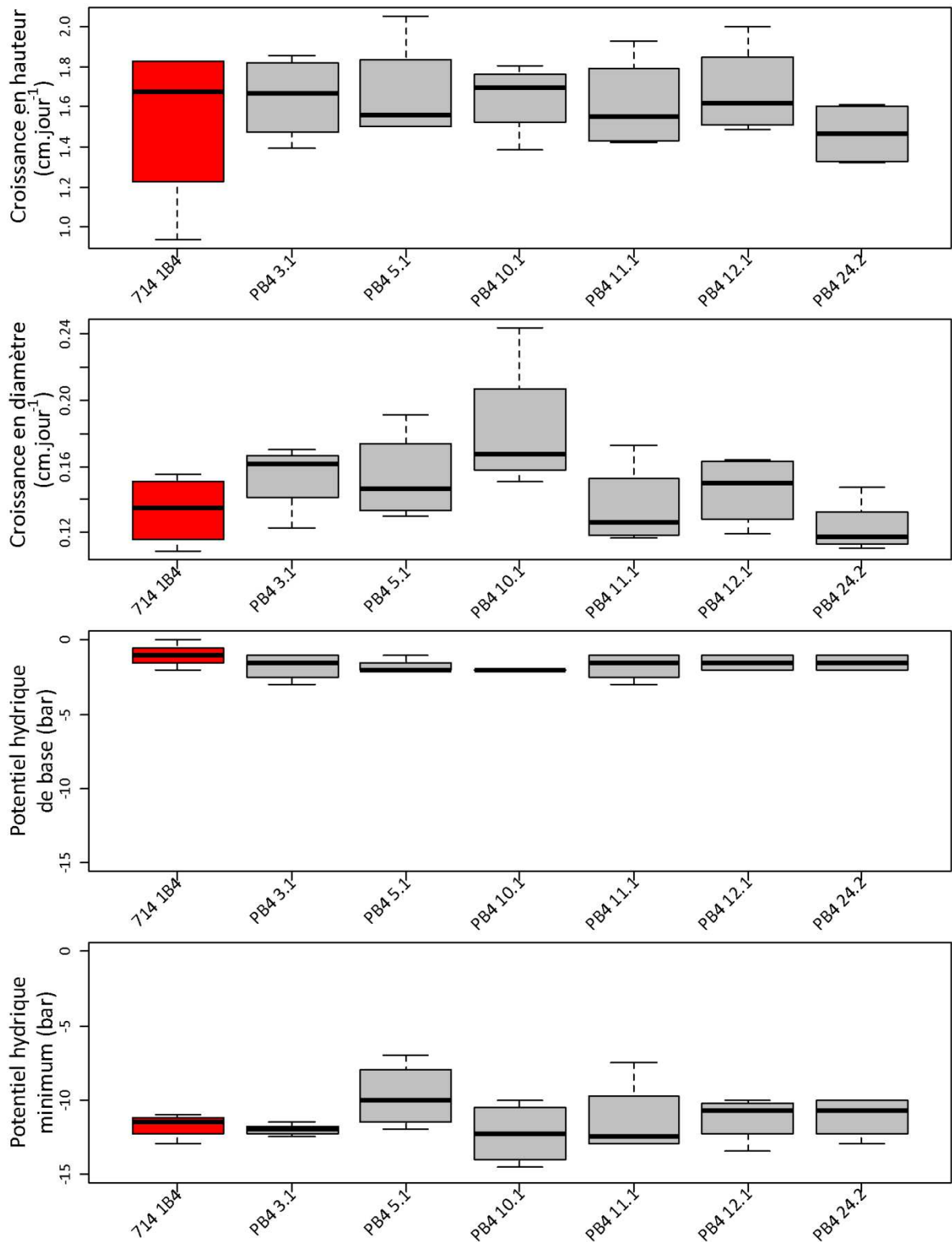


Figure 49 : Croissances de la tige et potentiels hydriques foliaires des lignées *4CL1 :: AnPGII*. Les lignées transgéniques ont été comparées aux plantes non-transformées (717-1b4) et n'ont pas présenté de différences significatives pour les croissances primaire, secondaire, et les potentiels hydriques de base et minimum (ANOVA, $P < 0.05$). Les résultats portent sur 3 à 4 plantes par lignée. Les boîtes à moustaches représentent la distribution des données avec la médiane représentée par un trait noir et les barres d'erreur aux extrémités de la boîte représentent 95 % de la distribution des valeurs.

entre 2 H et 2 H 30 puis le potentiel minimum est mesuré entre 12 H et 12 H 30 (temps solaires). Les plantes sont ensuite prélevées pour des mesures hydrauliques. Leur taux d'embolie native, leur conductivité et leur vulnérabilité à la cavitation sont mesurés.

Mesures de taux d'embolie native

Pour mesurer les taux d'embolie native, des échantillons de 50 cm sont prélevés à la base de la plante. Ils sont emballés dans des sacs plastiques noirs avec du papier humide et stockés à 4 °C. Les mesures sont réalisées dans les 48 H maximum suivant la récolte des échantillons. Des segments de tiges de 30 cm sont coupés sous l'eau avec une lame de rasoir, puis leurs extrémités apicales sont connectées à l'appareil Xyl'em (Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France). Le Xyl'em permet de mesurer la conductance d'un échantillon à l'aide d'un débitmètre. Une solution de KCl (10 mM) et CaCl₂ (1 mM) préalablement dégazée est utilisée pour perfuser les échantillons selon une direction basipétale. La conductance initiale (K_i) d'un segment de tige est mesurée à une pression de 60 mbar et à une température de 20 °C. Le segment est ensuite perfusé pendant 5 min à une pression de 1.5 bar afin d'éliminer l'embolie native puis une conductance maximale (K_{max}) est alors mesurée à une pression de 60 mbar. Le taux d'embolie native est estimé selon la formule :

$$PLC = \frac{1 - K_i}{K_{max}} \times 100$$

Mesures de conductivités

Les segments de tiges utilisés pour mesurer les taux d'embolie native sont ensuite raccourcis successivement et la conductivité (pour définition, cf section 1 du chapitre IV de l'introduction) est mesurée pour chaque longueur jusqu'à une taille minimale de 3 cm. La conductivité mesurée (K_n) des segments de différentes longueurs d'un échantillon est normalisée par rapport à la conductivité de l'échantillon de 30 cm. Les échantillons de 3 cm restant sont ensuite fixés avec le FAA pendant 16 H à 4 °C puis déshydratés progressivement par des bains d'éthanol successifs de 30 min, avec des concentrations 50 % puis 70 % (v/v) à 4 °C. Les échantillons sont alors conservés à 4 °C pour des analyses anatomiques. Des coupes radiales de 10-20 µm sont faites avec un microtome puis colorées à la safranine selon le protocole décrit en Annexe 8. Elles sont observées sous microscope, l'aire des vaisseaux est mesurée et leurs diamètres (D) correspondant en sont déduit :

$$D = 2\sqrt{\frac{Aire}{\pi}}$$

Ce diamètre est alors utilisé pour calculer la conductivité théorique (K_{ht}) selon la loi de Hagen Poiseuille :

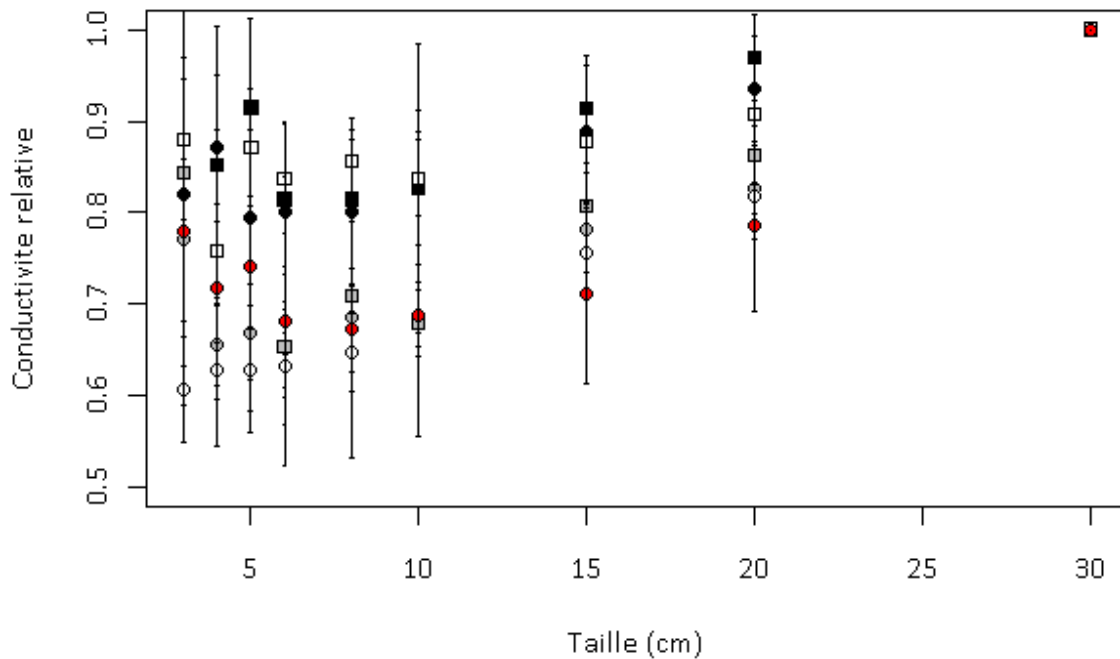


Figure 50 : Conductivités des tiges lignées *4CL1 :: AnPGII*. La conductivité est mesurée sur des segments de tiges de 30 cm puis sur des segments raccourcis successivement jusqu'à une taille minimale de 3 cm. La conductivité mesurée pour les segments de différentes longueurs d'un échantillon est normalisée par rapport à celui de 30 cm. Les conductivités des lignées *4CL1 :: AnPGII* ne sont pas significativement différentes de celle des plantes non transformées (rouge) (ANOVA, $P < 0.05$). Les données représentent les moyennes de 3 à 4 plantes par lignée et les barres l'erreur standard. 3.1 : rond noir, 5.1 : rond gris, 10.1 : rond blanc, 11.1 : carré noir, 12.1 : carré gris, 24.2 : carré blanc.

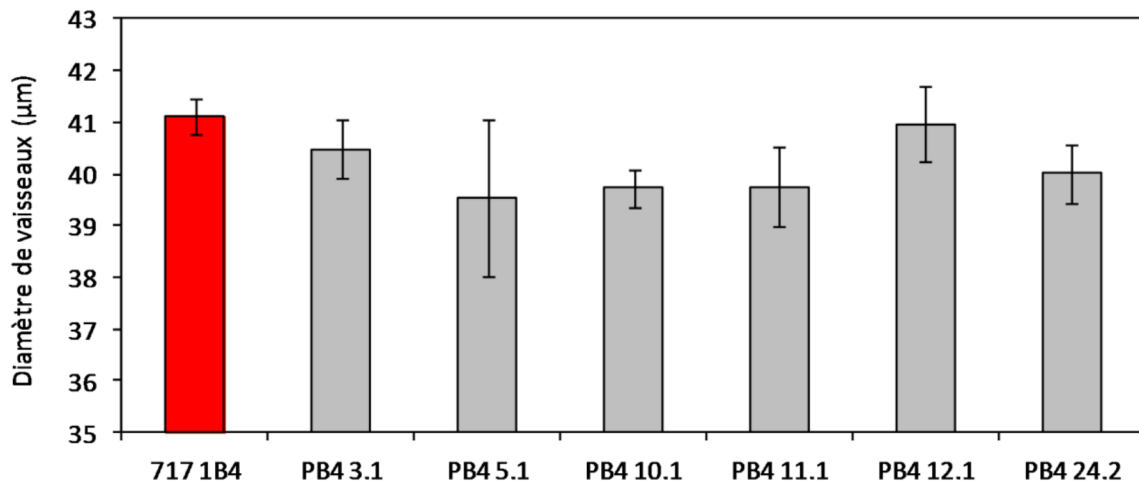


Figure 51 : Diamètre des vaisseaux chez les lignées *AnPGII*. Des coupes radiales de tiges de peupliers sont réalisées sur les échantillons utilisés pour les mesures de conductivité. L'aire des vaisseaux est évaluée et leurs diamètres correspondant en sont déduits. Les diamètres pour les lignées *4CL1 :: AnPGII* ne sont pas significativement différents de ceux des plantes non transformées (717-1B4, rouge), (ANOVA, $P < 0.05$). Les données représentent les moyennes d'un minimum de 200 vaisseaux mesurés sur 3 à 4 plantes par lignée et les barres l'erreur standard.

$$K_{ht} = \sum \frac{\pi D^4}{128 \eta}$$

avec η la viscosité de l'eau à 20°C. La conductivité théorique spécifique (K_{hts}) est ensuite calculée en divisant K_{ht} par l'aire de xylème.

Mesures de la vulnérabilité à la cavitation

Des segments de tiges sont prélevés à une hauteur de 50 cm des plants pour réaliser des mesures de vulnérabilité à la cavitation. Les segments mesurent 50 à 60 cm de long et environ 10 mm de diamètre. Des échantillons de 30 cm de long sont ensuite coupés avant la mesure à l'aide d'une lame de rasoir et la vulnérabilité à la cavitation des lignées *4CL1 :: AnPGII* est évaluée avec la technique du Cavitron, avec 3 ou 4 individus par lignée (Cochard, 2002; Cochard et al., 2005). La technique du Cavitron repose sur l'utilisation de la force centrifuge pour générer des pressions hydrostatiques négatives au sein de l'échantillon et sur la mesure en simultanée de la conductance. Chacune des extrémités de l'échantillon est connectée à un réservoir d'eau. La vitesse de rotation et la distance des réservoirs conditionnent la tension appliquée selon l'équation :

$$P = 0.5 \rho \omega^2 R^2$$

avec ρ la densité de l'eau (1000 kg.m⁻³), ω la vitesse de rotation (rad.s⁻¹), R la distance entre l'axe de rotation et le ménisque d'eau le plus distal, au niveau des réservoirs. Une différence de distance entre les hauteurs des deux ménisques (r) permet de générer une faible différence de pression (ΔP) entre les deux réservoirs aux extrémités de l'échantillon. Cette différence sera à l'origine d'un flux traversant le segment de tige du réservoir le plus distal au réservoir le plus proximal.

$$\Delta P = 0.5 \rho \omega^2 (R^2 - (R - r)^2)$$

Une solution de KCl (10 mM) et CaCl₂ (1 mM) préalablement dégazée durant 20 min à l'aide d'une pompe à vide est utilisée pour perfuser les échantillons. La perte de conductance (PLC) est alors mesurée en continu. Les régressions non linéaires des courbes de vulnérabilité à la cavitation sont réalisées selon la fonction sigmoïdale (Pammenter and Vander Willigen, 1998)

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{(S/25 \times (P - P_{50}))}}$$

avec PLC le pourcentage de perte de conductance ; P la pression (MPa), P_{50} la valeur de pression induisant 50 % de PLC et S la pente de la courbe au niveau de P_{50} .

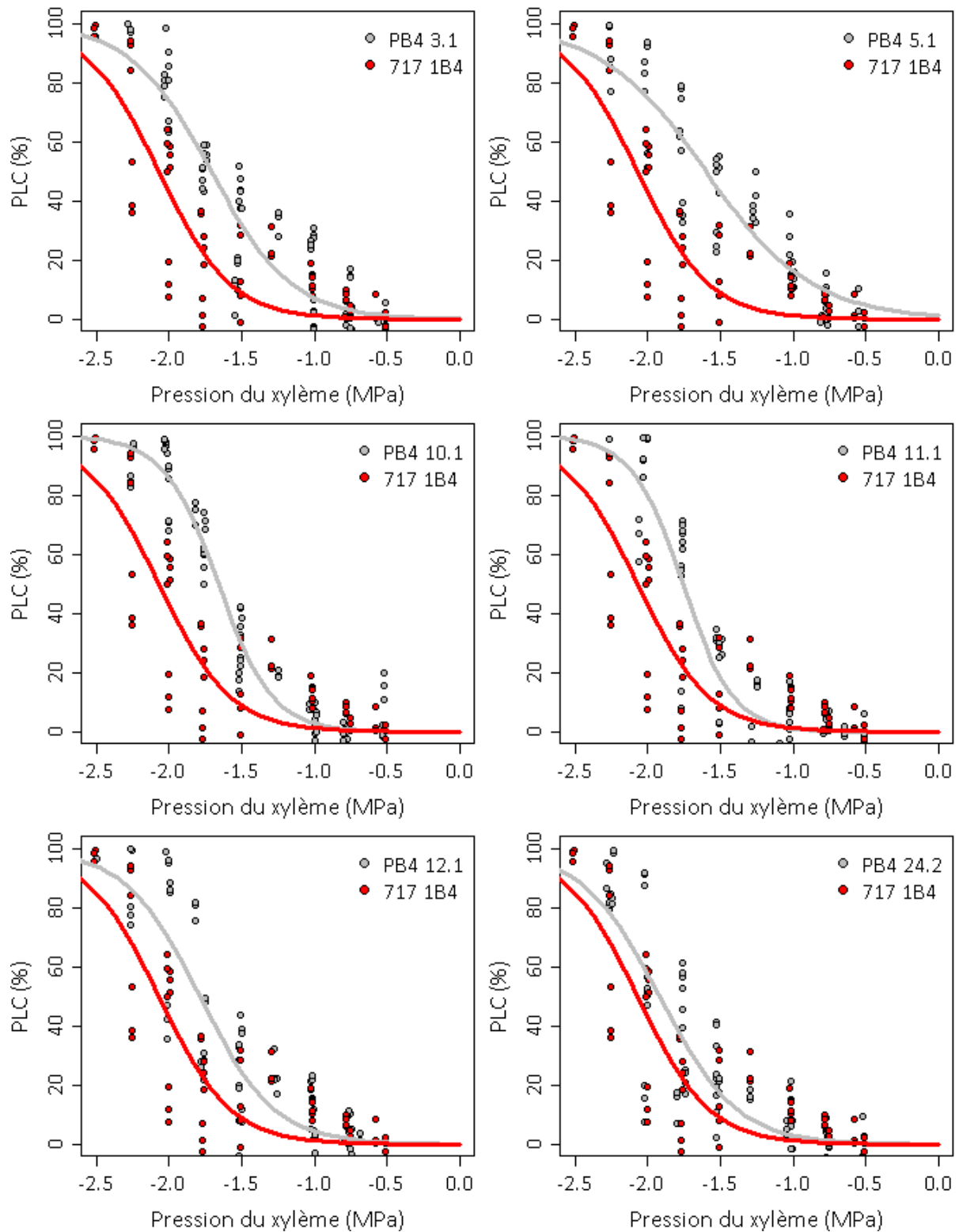


Figure 52 : Vulnérabilité à la cavitation des lignées 4CL1 :: *AnPGII*. Le pourcentage de perte de conductance (PLC) est mesuré pour différentes pressions appliquées au xylème. Les points représentent les mesures de PLC sur 3 à 4 individus par lignées pour des pressions de - 0.5 à - 2.5 MPa. Des paliers de pression sont réalisées tout les 0.25 MPa et plusieurs mesures sont réalisées par échantillons. Les courbes représentent les régressions sigmoïdales réalisées sur l'ensemble des mesures pour une lignée. La vulnérabilité à la cavitation des lignées transformées est significativement supérieure à la vulnérabilité à la cavitation de la lignée non transformée (717-1B4, rouge) (T-test, $P < 0.05$).

b) Résultats

Les résultats de mesures de croissances, de potentiels hydriques foliaires, et de taux d'embolie native des lignées *Pto4CL1 :: AnPGII* ont été statistiquement traités par analyse de variance et n'ont pas montré de différence significative avec les plantes non transformées (Figure 49).

La conductivité des échantillons diminue légèrement lorsque les échantillons sont raccourcis jusqu'à une longueur inférieure à la longueur moyenne des vaisseaux (Figure 50). En deçà de cette longueur, la conductivité augmente sensiblement car les résistances associées aux terminaisons de vaisseaux sont successivement enlevées. Les conductivités et diamètres de vaisseaux des lignées *4CL1 :: AnPGII* ne présentent pas de différences significatives avec les plantes non transformées (Figure 50 et 51).

Les lignées *4CL1 :: AnPGII* semblent présenter des vulnérabilités à la cavitation supérieures à celle de la lignée non transformée (Figure 52). Les plantes non transformées présentent un P_{50} moyen de -2.07 MPa, alors que les lignées 5.1 et 10.1 présentent des P_{50} moyen de -1.60 et -1.66 MPa, respectivement (Table 7). Toutes les lignées transformées présentent des valeurs moyennes de P_{50} significativement supérieures aux valeurs de P_{50} des plantes non transformées.

Table 7 : P_{50} des lignées *Pto4CL1* :: *AnPGII*. Le P_{50} représente la pression nécessaire à appliquer pour induire 50 % de perte de conductance. Les P_{50} des lignées transformées sont significativement supérieurs au P_{50} des plantes non transformées (717-1B4) (T-test sur coefficient de courbes, $P < 0.05$). Les différences significatives entre les P_{50} des lignées transformées et ceux des plantes non transformées sont indiquées d'une astérisque. Les données représentées sont les moyennes de 3 à 4 individus par lignée (\pm SE, erreur standard).

| Génotype | $P_{50} \pm SE$ (MPa) |
|----------|-----------------------|
| 717-1B4 | -2.07 ± 0.04 |
| PB4 3.1 | -1.71 ± 0.02 * |
| PB4 5.1 | -1.60 ± 0.03 * |
| PB4 10.1 | -1.66 ± 0.01 * |
| PB4 11.1 | -1.76 ± 0.02 * |
| PB4 12.1 | -1.79 ± 0.03 * |
| PB4 24.2 | -1.92 ± 0.03 * |

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La lignée *PtGMD2* n'a pas régénérée de plante. La surexpression de ce gène a probablement eu un effet important sur les parois, bloquant la dédifférenciation des cals en plantule (Ahn et al., 2006). Ce phénomène souligne la difficulté des approches transgéniques ciblant le métabolisme pariétal. Les lignées *35S :: AtAXS1* et *4CL1 :: PME1* ont rencontré des problèmes de contaminations. Une deuxième expérience de transformation de peuplier pourrait être envisagée pour ces constructions. A ce jour, le génotypage des lignées *Pta4CL1 :: PttPME1* et *Pta4CL1 :: GUS* n'est pas fini. Les amorces dessinées pour l'amplification du gène *PttPME1* ne semblent pas spécifiques du transgène. En effet, les résultats de PCR montrent une amplification de nombreuses bandes pour les couples d'amorces utilisés. La difficulté d'obtenir une amplification spécifique de ce transgène réside probablement dans la faible distance phylogénétique de *Populus tremula x tremuloides* qui est l'organisme d'origine de la séquence et *Populus tremula x alba*. *PME* est une large famille multigénique (Micheli, 2001) et les séquences de *P. tremula x alba* et *P. tremula x tremuloïdes* présentent probablement de fortes homologies. Le séquençage des produits de PCR nous dirait si l'amplification non spécifique se fait sur des séquences orthologues ou paralogues. Si les séquences sont orthologues, le suivi de leur expression serait utile car l'expression du gène orthologue endogène pourrait être influencée par le transgène (Napoli et al., 1990). Les lignées *Pto4CL1 :: PttPME1* doivent donc encore être génotypées et phénotypées. Des lignées *35S :: AtCsIA9*, *35S :: AtCsIC4* et *35S :: PtaXTH* et *4CL1 :: AnPGII* ont été régénérées et ont pu être génotypées. Les résultats de RT-PCR présentés en figure 48 mettent en évidence une surexpression des transgènes par les promoteurs *Pta4CL1* et *CAMV35S*, excepté pour les lignées *35S :: PtaXTH* 24.1 et X.12. Ces niveaux d'expression varient selon les lignées de chaque construction ainsi que selon le promoteur. Ces expériences d'analyse d'expression ont été réalisées sur une seule plante par lignée. Ces premiers résultats doivent être vérifiés sur d'autres plantes. Lors de ces expériences de génotypage, le nombre de copies insérées dans le génome devrait être estimé par Southern Blot. Faute de pouvoir utiliser un marquage radioactif, nous n'avons encore pas pu mener cette analyse ; et nous ne sommes pas parvenus à obtenir des résultats avec des sondes non radioactives de type digoxygénine (DIG), probablement en raison du manque de sensibilité de la sonde froide pour le génome de peuplier.

Les lignées *4CL1 :: AnPGII* semblent présenter des différences de vulnérabilité à la cavitation avec les lignées non transformées (Figure 52). Ce résultat est à valider par des mesures supplémentaires, compte tenu du faible nombre d'individus étudiés par lignée avec notamment trois individus non transformés. Une deuxième expérience de phénotypage comparant les lignées 5.1 et 10.1 qui présentent les valeurs de P_{50} les plus élevées, avec les plantes non transformées est à faire sur un plus grand nombre d'individus. La lignée 10.1 présente le plus fort niveau d'expression du gène *AnPGII* et ce génotype semble être en adéquation avec le phénotype de plus forte vulnérabilité

à la cavitation. En revanche, cette relation est moins claire pour la lignée 5.1 et aucune corrélation claire n'est observable entre les expressions des transgènes et les phénotypes des lignées. Il est probable que la technique de mesure de vulnérabilité à la cavitation n'ait pas un niveau de résolution suffisant, ou que le nombre de répétitions de mesures de vulnérabilité à la cavitation et de qPCR ne soit suffisant pour traduire les différences d'expression du transgène entre lignées. Nos résultats suggèrent que la surexpression du gène *AnPGII* n'affecte pas les paramètres de croissance et de conductivité des plantes. Les lignées 5.1 et 10.1 présentent des croissances en diamètre relativement élevées par rapport aux autres lignées bien que cette différence ne soit pas significative. Le faible effet du transgène sur la conductivité s'explique en partie par une absence d'effet sur la structure des vaisseaux (Figure 50), car une variation des dimensions des vaisseaux aurait un effet sur la conductivité. Nos résultats montrent d'ailleurs que les diamètres de vaisseaux ne sont pas affectés (Figure 51). Le promoteur induit l'expression du transgène tardivement dans la xylogénèse, et les dimensions des vaisseaux et des ponctuations seraient déjà définies au moment de son expression. Un effet sur l'aire de ponctuation du transgène semble donc peu plausible. En revanche, la surexpression de ce gène pourrait altérer les propriétés intrinsèques des membranes de ponctuation, notamment leurs propriétés mécaniques ou encore leur porosité en altérant des chaînes *HG*. Le phénotype d'augmentation de la vulnérabilité à la cavitation s'accorde avec ces hypothèses. Cela nécessite donc d'être vérifié par une analyse de l'anatomie du bois des lignées transformées, en particulier des ponctuations. La structure des ponctuations devrait être analysée finement par des approches de microscopies électroniques. La longueur des vaisseaux et l'aire de ponctuation pourraient aussi être quantifiées afin de vérifier l'absence d'effet du transgène sur ces variables. Il est possible que des différences structurales à l'origine de cette faible variation de P_{50} , (inférieure à 0.5 MPa) ne soient pas détectables. Les conditions de phénotypage sont donc à adapter pour maximiser leur résolution. Typiquement, la taille de l'échantillonnage doit être plus grande que pour une comparaison entre espèces. Par exemple, pour calculer la longueur des vaisseaux, il faudrait augmenter le nombre de mesures par segment de tige par rapport à la méthode développée par Sperry et al., (2005). L'utilisation du modèle de déformation des ponctuations pourrait aussi permettre d'intégrer des faibles variations des dimensions de la ponctuation qui auraient des conséquences importantes sur les propriétés des ponctuations.

Des différences de vulnérabilité à la cavitation ont été observées sur des lignées transgéniques de peuplier (Coleman et al., 2008; Awad, 2011; Voelker et al., 2011; Awad et al., 2012) avec une diminution du P_{50} atteignant 1 MPa pour des lignées présentant une réduction de la teneur en lignine (Coleman et al., 2008; Voelker et al., 2011). Toutefois, ces phénotypes forts sont souvent associés à des phénotypes de collapsés qui ne sont généralement pas observés en conditions naturelles. Les augmentations de vulnérabilité à la cavitation chez des plantes transgéniques qui ne

sont pas associées à des collapses présentent des valeurs plus faibles de l'ordre de 0.25 MPa (Awad, 2011; Awad et al., 2012). Les variations de vulnérabilité à la cavitation chez les lignées *4CL1 :: AnPGII* sont dans cet ordre de grandeur. De plus, cette augmentation de vulnérabilité à la cavitation serait associée à des variations au niveau des ponctuations. Les résultats de ce chapitre et la pertinence de cette approche seront discutés en regard des apports récents de la littérature dans la partie discussion générale.

UTILISATION DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA POUR PROSPECTER LES BASES GENETIQUES DE LA VULNERABILITE A LA CAVITATION

Nous présentons l'approche de criblage de mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour la vulnérabilité à la cavitation. Nous avons développé des méthodes de phénotypage afin d'utiliser *Arabidopsis thaliana* comme plante modèle pour l'étude des fonctions hydrauliques du xylème. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « *Journal of Experimental Botany* ». Nous prospectons la variabilité phénotypique et génétique de la vulnérabilité à la cavitation de l'espèce. Des mutants modifiés pour le métabolisme des pectines sont caractérisés.

Le modèle *Arabidopsis thaliana* nous a permis aussi d'apporter des preuves de l'importance de la vulnérabilité à la cavitation pour l'adaptation à des milieux contraignants et de son probable lien avec le port ligneux de certaines espèces. Le double mutant *socful* présentant un port ligneux présente une résistance à la cavitation plus grande que des plantes non transformées. Ce travail est développé dans une revue publiée dans « *Current Opinion in Plant biology* ».

RESEARCH PAPER

Arabidopsis thaliana as a model species for xylem hydraulics: does size matter?

Aude Tixier^{1,2}, Hervé Cochard³, Eric Badel³, Anaïs Dusotoit-Coucaud¹, Steven Jansen² and Stéphane Herbette^{1,*}

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177, Aubière, France

² Institute for Systematic Botany and Ecology, Ulm University, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081, Ulm, Germany

³ INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: stephane.herbette@univ-bpclermont.fr

Received 5 February 2013; Revised 26 February 2013; Accepted 1 March 2013

Abstract

While *Arabidopsis thaliana* has been proposed as a model species for wood development, the potential of this tiny herb for studying xylem hydraulics remains unexplored and anticipated by scepticism. Inflorescence stems of *A. thaliana* were used to measure hydraulic conductivity and cavitation resistance, whereas light and electron microscopy allowed observations of vessels. In wild-type plants, measured and theoretical conductivity showed a significant correlation ($R^2 = 0.80$, $P < 0.01$). Moreover, scaling of vessel dimensions and intervessel pit structure of *A. thaliana* were consistent with structure–function relationships of woody plants. The reliability and resolution of the hydraulic methods applied to measure vulnerability to cavitation were addressed by comparing plants grown under different photoperiods or different mutant lines. Sigmoid vulnerability curves of *A. thaliana* indicated a pressure corresponding to 50% loss of hydraulic conductance (P_{50}) between -3 and -2.5 MPa for short-day and long-day plants, respectively. Polygalacturonase mutants showed a higher P_{50} value (-2.25 MPa), suggesting a role for pectins in vulnerability to cavitation. The application of *A. thaliana* as a model species for xylem hydraulics provides exciting possibilities for (1) exploring the molecular basis of xylem anatomical features and (2) understanding genetic mechanisms behind xylem functional traits such as cavitation resistance. Compared to perennial woody species, however, the lesser amount of xylem in *A. thaliana* has its limitations.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, bordered pit, cavitation resistance, hydraulic conductivity, inflorescence stem, xylem.

Introduction

Xylem functional traits play an important role in understanding plant distribution, primary productivity, growth rate, resistance to abiotic factors (e.g. drought and frost), and the capacity of plants to adapt to changing environmental conditions over time (Tyree and Zimmermann, 2002; McDowell *et al.*, 2008; Brodribb and Cochard, 2009; Pittermann, 2010). Not surprisingly, there is a considerable amount of homoplasy in xylem anatomy of plants as a result of ecological adaptations for efficient water transport, hydraulic safety against embolism, and mechanical support (Sperry, 2003; Rowe and Speck, 2005). Ecological adaptations that determine these

major xylem structure–function relationships are reflected in the large anatomical variation of the hydraulic network (Carlquist, 2001; Choat *et al.*, 2008).

Understanding of functional traits associated with long-distance water transport in plants requires not only integration of hydraulics with anatomy and ecology, but also with plant genetics. However, genetic aspects of hydraulic parameters remain little studied. Firstly, there are practical problems impeding the study of genetic mechanisms in trees, in particular their slow growth and long generation times, which make the production and isolation of mutants laborious and time

consuming (Chaffey *et al.*, 2002; Groover, 2005). Secondly, it remains difficult to link gene function with quantitative physiological traits such as hydraulic efficiency or drought tolerance, because these physiological traits are the result of integrated and balanced genetic processes. Besides, comparison of genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance among natural populations show frequently high phenotypic plasticity and a lack of genetic differentiation across populations (Lamy *et al.*, 2011; Wortemann *et al.*, 2011), although others have shown that there is no phenotypic plasticity in cavitation resistance of stem wood (Alder *et al.*, 1996; Kolb and Sperry, 1999) and genetic differentiation in some species (Mencuccini and Comstock, 1997). As a result, insights into the genes controlling vulnerability to cavitation and xylem hydraulic conductivity are still lacking, despite their physiological importance in trees.

Transgenic trees make it possible to study the function of genes identified by genomic approaches and provide useful models to understand the genetic basis of xylem functional traits (Mellerowicz *et al.*, 2001; Chaffey *et al.*, 2002; Awad *et al.*, 2012). Nevertheless, investigations on the genetic basis of xylem hydraulic traits using transgenic trees are rare and the approach by gene overexpression shows limitations in research on the genetic bases of traits. In order to overcome the above-mentioned problems associated with trees, *Arabidopsis thaliana* has been proposed as a model plant to investigate the genetic basis of wood formation (Chaffey *et al.*, 2002; Nieminen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011). Chaffey *et al.* (2002) emphasized the strong similarities in anatomy and development of secondary xylem between *A. thaliana* and *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx. *A. thaliana* has also been suggested as a model species for many other wood traits (Boerjan *et al.*, 2003; Flaishman *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004; Wyatt *et al.*, 2010; Haughn and Western, 2012; Lens *et al.*, 2012b). Thus, it seems reasonable to question whether the inflorescence stem of *A. thaliana* can also be used as a model for xylem hydraulics despite its herbaceous and minuscule nature. Since there are strong differences in habit between perennial plants and short-living herbs, the xylem hydraulic characteristics of *A. thaliana* deserve special attention.

The main goal of this paper is to investigate if standard techniques applied in the field of xylem hydraulics are practically appropriate to inflorescence stems of *A. thaliana*, which are thought to have similar functions as stems of woody plants. Indeed, the inflorescence stem shows secondary growth (Altamura *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2004), allows long-distance water transport from the roots to leaves, flowers, seeds and fruits, and is also subject to similar mechanical constraints as a tree canopy, namely their weight, gravitropism, and various external perturbations (Telewski, 2006). Additionally, special attention is paid to hydraulically significant structures such as xylem vessels and bordered pits to evaluate the hydraulic properties of *A. thaliana*. Given various similarities in xylem structure between *A. thaliana* and woody eudicots (Chaffey *et al.*, 2002; Lens *et al.*, 2012b), the present study hypothesized that inflorescence stems of *A. thaliana* show a similar hydraulic behaviour as many shrubs and trees. If this assumption was correct and if measuring hydraulic parameters was feasible, a wide range of

genetic techniques and approaches could be applied to facilitate links between xylem physiology, anatomy, and genetics.

The reliability and resolution of the hydraulic techniques were verified by measuring the effect of growth conditions and genetic differences on cavitation resistance. An interesting aspect of this annual herb is that xylem development is controlled by flowering time, which can be influenced by several environmental cues such as photoperiod (Melzer *et al.*, 2008; Sibout *et al.*, 2008). Differences in secondary xylem development between short-day plants and long-day plants were hypothesized to parallel differences in cavitation resistance. Overall, such work could offer new opportunities for understanding functional hydraulic traits (safety vs. efficiency) regarding the developmental and evolutionary shift from primary xylem towards secondary xylem. Moreover, this study explored potential differences in cavitation resistance in three mutant lines modified for genes involved in the primary wall metabolism.

Materials and methods

Plant material

Seeds from wild-type (WT) *A. thaliana* (L.) Heynh. Columbia (Col-0) and T-DNA insertion mutant lines were provided by the NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre). The sequence-indexed *A. thaliana* T-DNA insertion mutant sequences were provided by the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. The polygalacturonase mutant (*PG*, SALK_100709, on locus At1g19170) was chosen because its locus had a stem-specific expression pattern (Kim *et al.*, 2006) and it is an orthologue of the *Populus tremula* × *tremuloides* POPTR_0006s14170 gene encoding for a polygalacturonase and upregulated during xylem maturation (Hertzberg *et al.*, 2001). The choice for the pectin methylesterase loci (*PME3*, SALK_059908 on locus At2g45220 and *PME5*, SALK_012478 on locus At3g59010) was based on the availability of SALK mutants on PME genes and expression patterns. *PME3* showed an inflorescent stem xylem expression that responded to changes in lignin biosynthesis in cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) mutant lines (Sibout *et al.*, 2005). *PME5* (At3g59010) was expressed in inflorescent stem xylem (Winter *et al.*, 2007) and was upregulated while promoting secondary growth (Koizumi *et al.*, 2009). Insertion and T-DNA zygosity were checked in *PG*, *PME3*, and *PME5*, based on screening for kanamycin resistance.

Seeds were sown on a commercial soil mixture (Humustar, Champeix, France) and grown in a growth chamber under long-day (16/8 light/dark) or short-day (12/12 light/dark) conditions. A second set of WT plants with *PG* and *PME* mutants were grown in long-day conditions. The plants were cultivated at 22/20 °C under light intensity 100–200 μmol m⁻² s⁻¹ and with relative humidity 60%. Phenotypes and genotypes were randomly distributed in the growth chamber in order to limit potential variability in light intensity. As soon as inflorescence stems showed a first silique ripening (i.e. after 7–8 weeks), they were harvested and immediately used for analysis.

Xylem anatomy

Light microscopy

Anatomical analysis was performed on long-day plants. Transverse sections (thickness 0.5 μm) were sectioned and stained with toluidine blue (0.5% in 2.5% carbonate buffer, pH 11). Toluidine blue stains vessels in blue and fibres and parenchyma cells in purple. The sections were examined under an optical microscope (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Germany), and images of whole sections were recorded using a digital camera (AxioCam, HR, Zeiss) and AxioVision digital imaging software. After their hydraulic conductivity was measured, vessel

areas were measured on 50 μm cross-sections of basal inflorescence stems from eight plants. After spatial calibration, the surface area of vessels was calculated using ImagePro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For each sample, a graphic tablet (Wacum Technology, Vancouver, WA, USA) was used to measure each vessel area. The circle diameter (D) with a surface area corresponding to the vessel surface area was then deduced (Christman and Sperry, 2010). A hydraulically weighted vessel diameter (D_h) was calculated following Sperry *et al.* (1994) as $D_h = \Sigma D^5 / \Sigma D^4$. Metaxylem and secondary xylem were defined according to Altamura *et al.* (2001). Theoretical hydraulic conductivity (K_{ht}) of the lumen was calculated as $K_{ht} = \Sigma \pi D^4 / 128 \eta$, where η was the viscosity at 20 °C. The total theoretical specific conductivity (K_{hts}) was obtained by dividing K_{ht} by the total lumen area. This approach was chosen because it compensated for differences in vessel size and number, and it removed the contribution of non-conducting cells in xylem tissue of herbaceous plants (Kocacinar and Sage, 2003).

To determine the proportion of open vessels in stem segments of different lengths, the vessel-length distribution of three *A. thaliana* inflorescence stems grown under long-day conditions was measured. Stems were fixed in a solution containing (v/v) 3.7% formaldehyde, 5% acetic acid, and 50% ethanol, gradually dehydrated using solutions from 50 to 100% ethanol, and dried at 65 °C overnight. Then, one end of the stem segments was injected with the silicone Rhodorsil RTV-141 (Rhodia, Cranbury, NJ, USA), which was mixed with the fluorescent dye Uvitex OB (Ciba UK, Bradford, West Yorkshire, UK). Injection was conducted basipetally with a vacuum pump at 0.2 MPa for 30 min. After drying, thin sections were cut with a cryomicrotome at various distances from the injection point, and the ratio of vessels filled with silicone per total number of vessels (N_L) was determined for each distance. The conduit length distribution was calculated according to Sperry *et al.* (2005) as $N_L = N_0 e^{-(kL)}$, where N_0 is the ratio between the number of silicon-filled vessels and the total number of vessels at the injection surface, L the distance from the injection point, and k the best fit extinction coefficient.

Electron microscopy

Samples for transmission electronic microscopy (TEM) were prepared according to Jansen *et al.* (2009). Observations were carried out on transverse sections using a JEM1210 microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 80 kV. Digital images were taken using a Mega View III camera (Soft Imaging System, Münster, Germany) and analysed using ImageJ software (Rasband, 1997–2012).

For scanning electron microscopy (SEM), several inflorescence stems of *A. thaliana* were cut into 0.5–1 cm segments, split longitudinally, and dried at 65 °C overnight. Samples were fixed to aluminium stubs and coated with platinum using an BAF100 sputter coater (Balzers, Dietenheim, Germany) for 3 min. Samples were observed with a S-5200 field-emission scanning electron microscope (Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 2 kV.

Xylem hydraulics

Experimental specific conductivity

The hydraulic conductivity (K_h) was measured on 1-cm-long segments of basal inflorescence stem in order to decrease the pit resistivity and compared with K_{ht} . K_h was measured from eight plants grown under long-day conditions using a Xylem apparatus (Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France). Stem segments were cut under water and gently sealed to a tubing system using thread seal tape (polytetrafluoroethylene film) to avoid leaking and crushing of samples with clamps. A solution containing KCl (10 mM) and CaCl (1 mM) was used to perfuse stems basipetally and flush them at 21 °C for 5 min under 0.1 MPa. The flow rate was measured 10 minutes after starting the perfusion under 6–9 kPa. The specific hydraulic conductivity (K_{hs}) was obtained by dividing K_h by the total vessel lumen area.

K_h was also measured on 5-cm-long basal inflorescence stems from six other plants grown under long-day, in order to evaluate the

sample length effect on K_h . Perfusion was performed following the same methods as above. Stem segments were perfused basipetally and shortened every 0.5 cm.

Xylem vulnerability to cavitation

The vulnerability to cavitation of inflorescence stems was assessed using the centrifugal technique (Alder *et al.*, 1997; Cochard, 2002) on 14-cm-long samples. For this purpose, the embolism rate was measured using a XYLEM apparatus following procedures described for woody species (Sperry *et al.*, 1988; Cruiziat *et al.*, 2002). This technique involved measuring the hydraulic conductance of segments before and after flushing (k_i and k_{max} , respectively). Two stem segments 1–2 cm long were cut under water from the middle part of the stem. The basal cut end was then connected to the hydraulic apparatus. A solution containing KCl (10 mM) and CaCl₂ (1 mM) was used to perfuse the stem segments. k_i and k_{max} were measured under 6–9 kPa on both segments separately in order to increase the number of repetitions for each plant. Before measuring k_{max} , samples were flushed for 5 min at 0.1 MPa to remove embolism. To draw a single vulnerability curve, 15–46 samples from 15–24 different stems were required. This study also tentatively applied the bench drying method (Sperry *et al.*, 1988), the Cavitron technique (Cochard, 2002; Cochard *et al.*, 2005), and the single-ended pressure chamber approach (Cochard *et al.*, 1992). The PLC curves were fitted using the sigmoid function of Pammenter and van der Willigen (1998), $PLC = 100 / (1 + e^{(S/25 \times (P - P_{50})))})$, where P_{50} is the pressure causing 50% loss in conductance, and S the curve slope at this point.

Results

Anatomy of xylem vessels and pits

The xylem of *A. thaliana* was organized in vascular bundles (Fig. 1A), with (mean \pm SE) 9.4 ± 0.9 bundles per transverse section and 19.5 ± 1.7 vessels per vascular bundle (Fig. 1B). The vessels can be distinguished from other cell types because of differences in the staining reaction of cell walls with toluidine blue (Fig. 1B). Additional evidence for vessel identification was based on silicon injection (Fig. 1C). Vascular bundles included both primary metaxylem and secondary xylem with differences in their respective proportions across vascular bundles (Fig. 1A). Primary xylem consisted of relatively wide vessels ($16.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$), while secondary xylem was characterized by narrower vessels ($11.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$) in combination with xylem fibres. Ray cells were absent in the xylem of the samples studied. The mean vessel diameter D was $11.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (Fig. 2A), with mean D_h of $17.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ and mean vessel length (L) of $1.2 \pm 0.2 \text{cm}$ (Fig. 2B).

Neighbouring vessels were connected to each other via bordered pit fields (Fig. 1D–H). Three different pit types that were associated with vessels occurred in *A. thaliana*: intervesel pits (Fig. 1E), vessel-fibre pits (Fig. 1D), and vessel-parenchyma pits (not shown). The pit dimensions are summarized in Table 1. *A. thaliana* had vested pits (Fig. 1E, F, H), showing branched protuberances from the secondary cell wall of the pit chamber. The vestures partly occluded the pit aperture (Fig. 1F, H).

Xylem hydraulics

Hydraulic conductivities (K_h) were in the range of 1.10^{-11} to $12.10^{-11} \text{m}^4 \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$. K_h was linearly correlated to the

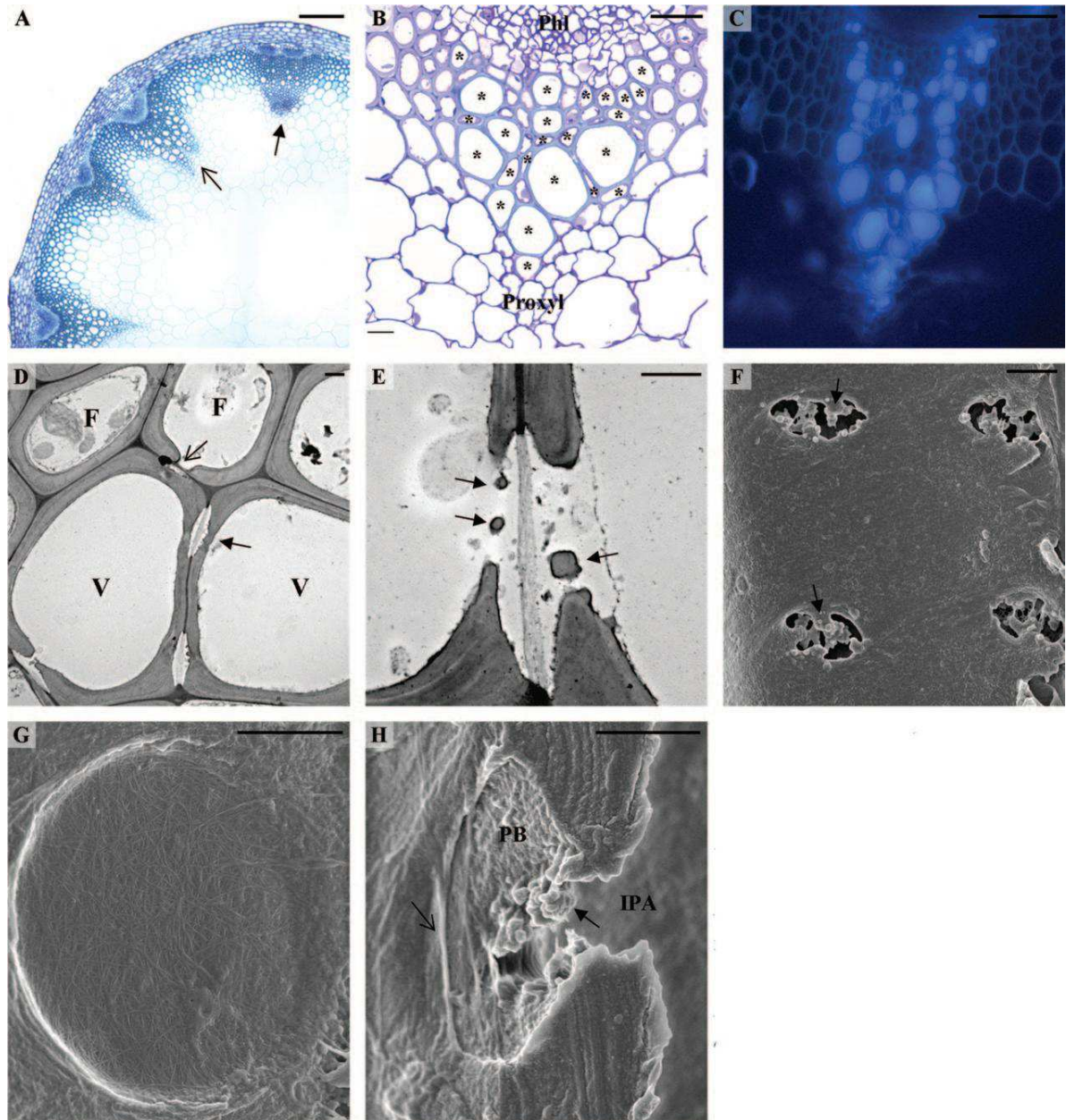


Fig. 1. Anatomical features of the xylem in the inflorescence stem of *A. thaliana*. (A) Transverse sections showing xylem organization in vascular bundles: the closed arrow shows a vascular bundle with secondary xylem dominance and the open arrow shows a vascular bundle with metaxylem dominance. (B) Detail of a vascular bundle with metaxylem and vessels marked by asterisks: toluidine blue stains vessels in blue and fibres and parenchyma cells in purple. (C) Transverse section of a vascular bundle from a stem injected with silicone: conductive vessels are filled with silicone mixed with the fluorescent dye Uvitex. (D) Transverse section of xylem vessels observed by TEM: the closed arrow shows an intervessel pit and the open arrow shows a vessel-fibre pit. (E) Intervessel pit observed with TEM: arrows show vestures. (F–H) SEM images of inner vessel wall with four vestured pit apertures (F), pit membrane (G), and pit chamber bearing vestures near the outer aperture (H): closed arrows show vestures and the open arrow shows a small part of the aspirated pit membrane. F, fibre; IPA, inner pit aperture; PB, pit border; Phl, phloem; Proxyl, protoxylem; V, vessel. Bars, 100 μm (A), 10 μm (B), 50 μm (C), 1 μm (D–H).

theoretical hydraulic conductivity (K_{ht}) predicted from the Hagen-Poiseuille equation ($R^2 = 0.80$). K_h was on average 41% lower than K_{ht} predicted for ideal capillaries. The measured (K_{hs}) and theoretical (K_{hts}) specific conductivities showed a strong linear relationship ($P < 0.01$; Fig. 3A). Fig. 3B showed

no significant change in K_h when shortening samples from 5 to 1 cm (*ANOVA*, $P < 0.05$).

This study was unable to obtain vulnerability curves following the bench drying or the single-ended cavitation chamber approach. Samples were flattened because of

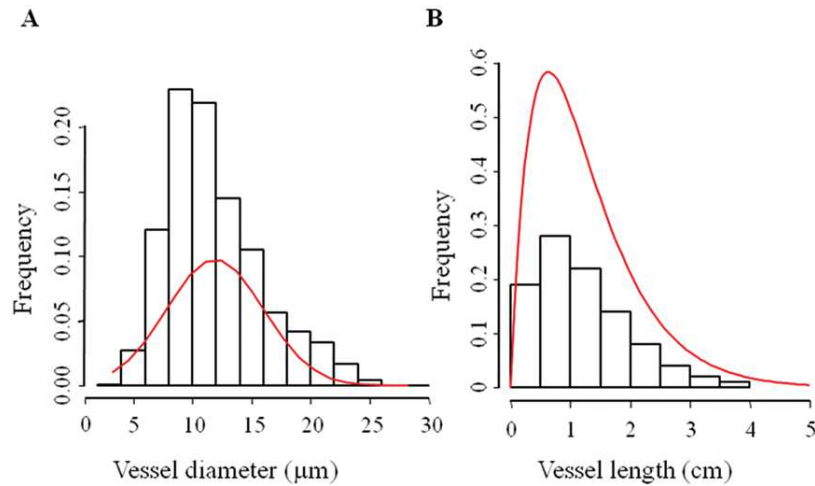


Fig. 2. Vessel diameter and vessel length distribution for inflorescence stem of *A. thaliana*. (A) Vessel diameter distribution analysed from eight plants. (B) Vessel length distribution analysed from three plants. Data are means \pm SE. Solid line indicates the average frequency of vessel length (Sperry *et al.*, 2005).

dehydration of the pith parenchyma, which made hydraulic measurements impossible because of leaks. This study was also unable to determine cavitation resistance using the Cavitron technique because the conductance of the inflorescence stems was too low to be measured accurately with this method.

Vulnerability curves were successfully obtained with the centrifuge approach (Fig. 4). *A. thaliana* had PLC values decreasing with xylem pressure, following a sigmoidal curve. Some PLC values appeared negative because of the centrifuge method employed (e.g. Adler *et al.*, 1997). The sigmoid regression analysis provided a strong fit with $R^2 > 90\%$. *A. thaliana* WT plants showed a P_{50} value of -2.53 ± 0.053 MPa and -2.98 ± 0.139 MPa when grown under long-day and short-day conditions, respectively, with a significant difference between both conditions (Student's t-test, $P < 0.05$).

The second set of WT plants grown under long-day conditions showed a P_{50} value of -2.54 ± 0.080 MPa. This value was not significantly different from the values obtained for *PME3* and *PME5* plants grown in same conditions, which were -2.49 ± 0.137 MPa and -2.44 ± 0.108 MPa, respectively (Fig. 4C, D). On the contrary, *PG* mutants showed a P_{50} value

of -2.25 MPa \pm 0.033, significantly different from WT plants (Student's t-test, $P < 0.05$, Fig. 4B).

Discussion

This study demonstrates that inflorescence stems of *A. thaliana* can be used to measure specific conductivity and cavitation resistance in an accurate and reliable approach. The hydraulic data obtained support this study hypothesis that *A. thaliana* shares both structural and functional xylem characteristics with many eudicots, which opens important opportunities to utilize this species for investigating xylem hydraulics. While there are various advantages of using *A. thaliana* for studying water transport in plants, its limitations also need to be considered.

Given the small size of the inflorescence stems of *A. thaliana*, the hydraulic pathway of the xylem can more easily be studied in its totality on a cross-section as compared to trees with large sapwood areas that include various growth rings. Indeed, theoretical conductivities can be performed on the total number of vessels and shows a strong linear relationship with measured conductivities (Fig. 3A). This also demonstrates that the vessels that contribute to hydraulic conductance can accurately be identified on transverse stem sections. Silicone injection (Fig. 1C) and dye perfusion (data not shown) also confirmed the conductive nature of vessels in the primary and secondary xylem.

Measured conductivity includes lumen and end-wall conductivity, whereas theoretical conductivity estimates only lumen conductivity. Based on the silicone injection experiments, 80% of the vessels are not open at both ends in the 1-cm stem segments used for measuring conductivity (Fig. 3A), and thus there would be an end-wall resistance to the flow. In order to evaluate the contribution of this resistance on 1-cm stem segments, stem-shortening experiments were performed on six samples (Fig. 3B). The maximum vessel length

Table 1. Intervessel pit morphology of *A. thaliana* inflorescence stem. Transverse sections of stems were observed under TEM and bordered pit characteristics and double intervessel wall thickness measured with image analysis. Values are mean \pm SE for n pits observed.

| Pit character | n | Size (μm) |
|---|-----|------------------------|
| Aperture diameter (D_a) | 19 | 0.69 ± 0.23 |
| Membrane diameter (D_p) | 17 | 3.55 ± 0.53 |
| Membrane thickness (T_m) | 20 | 0.17 ± 0.01 |
| Chamber depth (D_c) | 18 | 0.93 ± 0.66 |
| Double intervessel wall thickness (T_w) | 20 | 1.67 ± 0.69 |

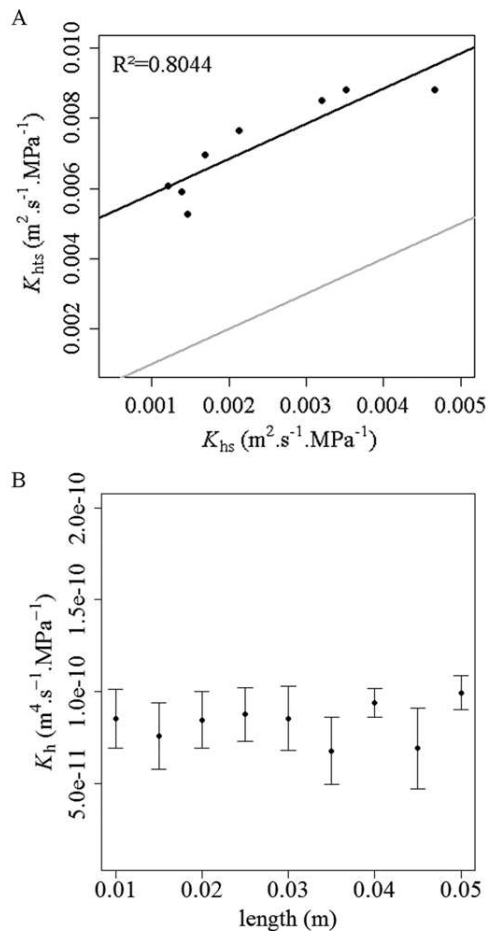


Fig. 3. Hydraulic conductivity of the inflorescence stem of *A. thaliana*. (A) Plot of the experimental (K_{hs}) versus theoretical (K_{hnts}) hydraulic specific conductivity. K_{hs} was measured on 1-cm-long basal inflorescence stems from eight plants, then K_{hnts} was calculated by measuring vessel diameters and applying the Hagen–Poiseuille law. Values are for each plant. The black line represents a linear correlation between K_{hnts} and K_{hs} ($K_{hnts} = 1.0043K_{hs} + 0.0048$; $R^2 = 0.8044$) and the grey line represents the 1:1 line. (B) Hydraulic conductivity (K_h) versus segment length. K_h was measured on 5-cm-long basal inflorescence stems that were perfused basipetally and shortened every 0.5 cm. Data are means \pm SE from six plants. There was no significant difference between means (ANOVA, $P < 0.05$).

measured with silicon injection (Fig. 2B) was smaller than 5 cm, meaning that all vessels had at least one end wall in 5-cm long samples. No significant difference in conductivity was found between 5- and 1-cm segments, suggesting that the specific conductivity can be estimated by working with 1-cm segments. In shorter segments, flow rates were higher and more precise compared to the theoretical specific conductivity. The 41% hydraulic efficiency of *A. thaliana* is in line with findings of both woody and herbaceous angiosperms, with measured conductivity values less than half of the theoretical values of ideal capillaries (Tyree and Zimmermann, 2002). Therefore, sap flow in *A. thaliana* seems to follow the Hagen–Poiseuille

efficiency model developed on woody plants (Sperry et al., 2005; Hacke et al., 2006). End-wall resistivity generally accounts for 50% of the total hydraulic resistivity (Lancashire and Ennos, 2002; Sperry et al., 2005; Choat et al., 2008) and thus can explain the lower conductivity measured. Although measuring the xylem conductivity of inflorescent stems can be achieved easily, quantification of the end-wall resistivity remains a technical challenge in *A. thaliana* because of the very short (<1 cm) sample length that would be required for such measurements.

The reliability and resolution of the vulnerability curves obtained are supported by the differences found between the growing conditions or the mutant lines of *A. thaliana* (Fig. 4). A significant difference was observed in vulnerability to cavitation between plants grown under long days and short days (Fig. 4A). Changes in the photoperiod from long to short days were shown to stimulate and prolong xylem development in the hypocotyls and inflorescence stems (Lev-Yadun, 1994; Chaffey et al., 2002). According to the present findings, an increase in wood production would enhance the resistance to cavitation of the inflorescence stem. Since secondary xylem is characterized by narrower vessels than metaxylem vessels, the secondary xylem would be less vulnerable to cavitation than metaxylem. Indeed, wider vessels would show a larger pit area, which may increase the likelihood of air-seeding via the largest pit-membrane pore (Wheeler et al., 2005; Hacke et al., 2006; Christman and Sperry, 2010; Christman et al., 2012). Differences in vessel grouping between primary and secondary xylem could offer an additional explanation (Lens et al., 2011), as well as potential differences in pit characters.

The vulnerability curves for *A. thaliana* (Fig. 4) showed P_{50} values ranging from -2.25 to -3 MPa. Meyre et al. (2001) showed that *A. thaliana* plants grown under short days were able to maintain an optimum transpiration rate for a soil water potential of -0.28 MPa and observed a complete decline in transpiration rate for a soil water potential of -1.3 MPa. In the present study, the predawn leaf water potential was -0.06 MPa and therefore within range of the optimal transpiration rate. Moreover, the pressure for stomata closure was a long way from the P_{50} values found in here, which suggests that the plant has a high safety margin (Cochard et al., 2002).

Some mutant lines were analysed to test if the *A. thaliana* stem is suitable and the technique is reliable to investigate the genetic bases for the vulnerability to cavitation. Mutant lines for pectin genes represent good candidates because they have an important role in elongation processes, determining cell size, shape, and stiffness (Kim et al., 2006). PG and PME are known to catalyse disassembly and structural modification of pectins (Wolf and Greiner, 2012). Changes in expression of these enzymes could thus have an effect on conduit dimensions and thus on pit density (Christman et al., 2009). Moreover, they could be involved in pit-membrane maturation and thus in its properties, especially its porosity. Pectin methylesterases catalyse the demethylesterification of homogalacturonan (HGA). These demethylesterified HGA can form calcium bonds, promoting an ‘egg-box’ model structure, or become a target for pectin-degrading enzymes, affecting the texture and rigidity of the cell wall (Pelloux et al., 2007). Herbertte and

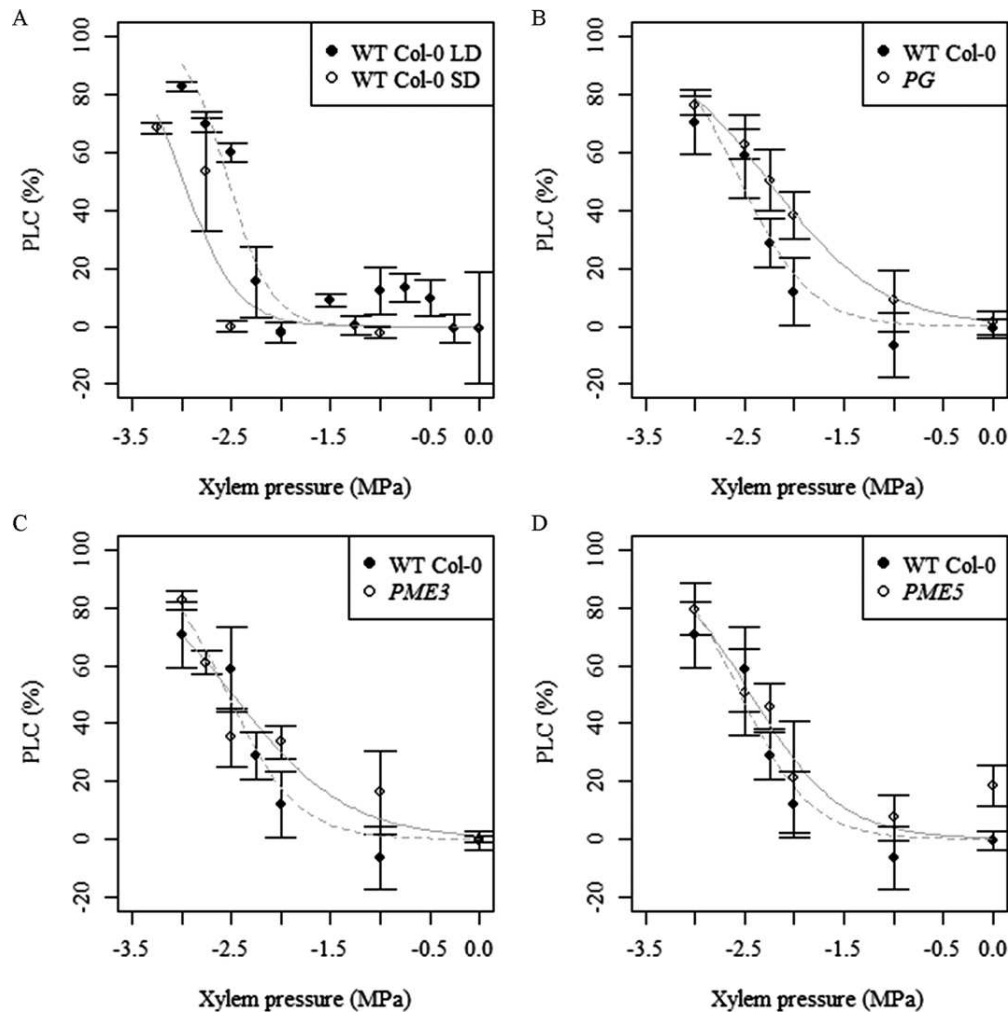


Fig. 4. Xylem vulnerability to cavitation of *A. thaliana* plants depending of the photoperiod or the genetic background. (A) Vulnerability curves of WT Col-0 plants grown under short days (SD, open circles) show a significant difference (Student's t-test, $P < 0.05$) with that of plants cultivated under long days (LD, closed circles). (B–D) Vulnerability curves of WT plants and mutants grown under long days. Vulnerability curves of WT (closed circles) show a significant difference (Student's t-test, $P < 0.05$) with *PG* mutants (open circles) (B), but no significant differences were found with *PME3* (C) and *PME5* (D) mutants (open circles). Values are means \pm SE from 2–8 stem samples, and 15–24 plants were required for each curve. Grey lines represent regression curves according to Pammenter and Vander Willigen (1998). WT, wild type.

Cochard (2010) proposed that the observed calcium effect on vulnerability to cavitation was due to calcium bridges in pectin chains of the pit membrane. Although no significant effect of the *PME3* and *PME5* mutations were detected, the present study cannot exclude *PME* as candidate genes involved in vulnerability to cavitation, especially when considering the size of this multigene family (67 genes, Micheli, 2001) and a potential compensation effect between isoforms. On the contrary, mutation of *PG* (multigene family of 66 genes, Kim *et al.*, 2006) showed a clear effect on cavitation resistance. Anatomical observations remain to be performed to understand the role of *PG*.

The P_{50} values for *A. thaliana* fall within the range of many tree species with a temperate distribution area. *Quercus robur*, for instance, has a P_{50} around -2.7 MPa (Cochard *et al.*, 1992). Although P_{50} values have not been determined for

many herbaceous species (Rosenthal *et al.*, 2010), the xylem of *A. thaliana* is rather cavitation resistant compared to other herbaceous plants, which could be explained by the distribution of *A. thaliana* on dry and sandy soils (Koornneef *et al.*, 2004). Examples are *Phaseolus vulgaris* L., which showed P_{50} values from -0.46 to -0.99 MPa (Mencuccini and Comstock, 1999), and *Epilobium angustifolium* L. with a P_{50} value around -1.6 MPa (Maherali *et al.*, 2009). Although both species show vestured pits (Jansen *et al.*, 2008), which are assumed to increase resistance to cavitation (Jansen *et al.*, 2003, 2004; Choat *et al.*, 2004), *A. thaliana* shows a higher cavitation resistance than these two species.

The hydraulic behaviour in *A. thaliana* appears to be paralleled by many similarities in xylem anatomy and ultrastructure between this species and woody eudicots. Despite the small scale of vessel dimensions in *A. thaliana*, the 3/2

scaling between average vessel length (L) and vessel diameter corresponding to mean lumen resistivity (D_{RL}), reported by Hacke *et al.* (2006) on 29 woody angiosperm species, is also found for *A. thaliana*. Vessel dimensions of *A. thaliana* indicate a scaling of $L = 0.044 D_{RL}^{3/2}$. This finding is in line with previous observations that narrow vessels are generally short, while wide vessels range from short to long (Sperry *et al.*, 2005; Hacke *et al.*, 2006; Christman and Sperry, 2010). However, Jacobsen *et al.* (2012) showed recently no relationship between these vessel traits among 130 species, and vessel length was hypothesized to be dependant of the species habit and diameter of samples. The low vessel dimensions in *A. thaliana* could then be explained by the narrow diameter of the inflorescence stem.

Other structural similarities between *A. thaliana* and woody plants include the presence of simple perforation plates and bordered pits. Simple perforation plates are characteristic of *Brassicaceae* and very common in eudicots (Schweingruber, 2006; Wheeler *et al.*, 2007). The mean pit-membrane thickness of *A. thaliana* (170 nm) is within the range observed for angiosperms (Jansen *et al.*, 2009; Lens *et al.*, 2011). These observations suggest similar structure–function relationships between *A. thaliana* and woody angiosperms at the pit-membrane level (Choat *et al.*, 2008).

The xylem of *A. thaliana* shows a rather limited amount of fibres, while woody plants generally show a high proportion of lignified ground tissue in their xylem. Based on pit micro-morphology and silicon injection data, this study assumes that the fibres in *A. thaliana* are hydraulically non-functional (Sano *et al.*, 2011). Moreover, the lack of rays in xylem of *A. thaliana* confirms observations by Chaffey *et al.* (2002), although ray cells have been detected in *A. thaliana* plants in which secondary growth was induced (Mazur *et al.*, 2012). Hence, *A. thaliana* has the genetic potential to develop ray cells, while rayless wood could be associated with paedomorphosis and secondary woodiness (Carlquist, 1962, 2009; Dulin and Kirchoff, 2010). Since the development of rays is delayed in a small number of eudicots, raylessness should be interpreted as a juvenile character and an example of heterochronic shift in xylem organization (Carlquist, 2009). Lens *et al.* (2012b) described paedomorphic wood features in woody double mutants of *A. thaliana* such as a continuously decreasing length-on-age curve of vessel elements and delayed periderm formation.

A. thaliana provides many advantages as a model plant. Environmental effects on hydraulic parameters can be more easily applied from a practical point of view to small plants than large trees. Knock-out mutants of *A. thaliana* allow the screening a large number of genes putatively involved in xylem hydraulics. The irregular xylem (*irx*) *A. thaliana* mutants have already brought various insights into the biochemical and genetic aspects of xylem structure (e.g. Turner *et al.*, 1997). The *A. thaliana* genome sequence (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) provides novel avenues for identification and systematic analysis of genes involved in cell-wall metabolism (Liepman *et al.*, 2010). Plant cell walls are extremely complex in their composition, biosynthesis, assembly, and post-assembly modifications (Popper *et al.*, 2011). Genes involved

in cell-wall synthesis or modification represent 10% of the genes in *A. thaliana* and they mainly belong to multigene families (Farrokhi *et al.*, 2006). Thus, *A. thaliana* is an excellent plant model for screening the functional significance of genes involved in xylem hydraulics by working on already characterized genes and ready-to-use mutant lines.

Given the short-life cycle of *A. thaliana*, its role as an ecophysiological model for trees remains questionable. Annual weeds with a short life cycle are often characterized by stress avoidance and show strong ecological differences with a tree habit. Considering the wide geographical range of *A. thaliana*, it is not surprising that this species shows a large variation in physiological processes in order to deal with contrasting environments worldwide (Pigliucci, 2002). Meyre *et al.* (2001) proposed, for instance, an adaptive drought-tolerance strategy for the Columbia ecotype in contrast to the escape strategy of the Langsberg ecotype, which has a shortened life cycle. Moreover, the woody double mutant *soe1 ful* of *A. thaliana* shows extensive secondary growth perennial-like features with prolonged plant lifetime (up to 18 months), co-occurrence of vegetative and reproductive meristems, and recurrent flowering cycles, and thus strong similarities with the habit of a tree (Melzer *et al.*, 2008; Lens *et al.*, 2012b). The use of such mutant could be of special interest for ecophysiological modelling. However, the use of xylem from reproductive organs is potentially problematic because genes affecting reproductive tissues could change the characteristics of the inflorescence xylem without being important for the systemic xylem of the vegetative part of the plant.

The ‘hidden woodiness’ of *A. thaliana* is found in many lineages of herbaceous plants, which frequently retain the capacity to develop secondary meristems and xylem following similar developmental patterns as woody trees, without special innovations of their bauplan or hydraulic plumbing system (Spicer and Groover, 2010; Lens *et al.*, 2012a; Rowe and Paul-Victor, 2012). A fuzzy boundary between morphological categories is common in many organisms, especially in plants (Sattler and Rutishauser, 1997), which has implications in the functional understanding of processes such as water transport. The traditional view of classifying species and features into mutually exclusive categories such as herbaceous or woody ignores the dynamic continuum of growth forms, and similarities in structure–function. From a functional and anatomical point of view, size does not matter and should not prevent the use of *A. thaliana* as a hydraulic model species, although the limited amount of xylem in combination with its short life cycle and low hydraulic demands do have some limitations. Therefore, validation on transgenic trees will certainly be needed.

Acknowledgements

The authors thank the electron microscopy section of Ulm University for assistance with TEM and SEM, and Pierre Conchon, Christian Bodet, Christelle Boisselet (UMR_A 547 PIAF INRA) and Elisabeth Allain (UMR 6247 GRED) for advice and technical assistance. The Botanical Garden of Ulm University is acknowledged for cultivating plant

material. This research was founded in part by the PitBulles project (ANR no. 2010 Blan 171001). The authors also thank the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants and the NASC Institute for providing seed material.

References

- Alder NN, Pockman WT, Sperry JS, Nuismer S.** 1997. Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany* **48**, 665–674.
- Alder NN, Sperry JS, Pockman WT.** 1996. Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* **105**, 293–301.
- Altamura MM, Possenti M, Matteucci A, Baima S, Ruberti I, Morelli G.** 2001. Development of the vascular system in the inflorescence stem of *Arabidopsis*. *New Phytologist* **151**, 381–389.
- Awad H, Herbette S, Brunel N, Tixier A, Pilate G, Cochard H, Badel E.** 2012. No trade-off between hydraulic and mechanical properties in several transgenic poplars modified for lignin metabolism. *Environnement and Experimental Botany* **77**, 185–195.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 519–546.
- Brodribb TJ, Cochard H.** 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* **149**, 575–584.
- Carlquist S.** 1962. A theory of paedomorphosis in dicotyledonous woods. *Phytomorphology* **12**, 30–45.
- Carlquist S.** 2001. *Comparative wood anatomy: systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood*, 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag.
- Carlquist S.** 2009. Xylem heterochrony: an unappreciated key to angiosperm origin and diversifications. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 26–65.
- Chaffey N, Cholewa E, Regan S, Sundberg B.** 2002. Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiologia Plantarum* **114**, 594–600.
- Choat B, Cobb AR, Jansen S.** 2008. Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New Phytologist* **177**, 608–625.
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM.** 2004. Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1569–1575.
- Christman MA, Sperry JS.** 2010. Single-vessel flow measurements indicate scalariform perforation plates confer higher flow resistance than previously estimated. *Plant, Cell and Environment* **33**, 431–443.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR.** 2009. Testing the ‘rare pit’ hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**, 664–674.
- Christman MA, Sperry JS, Smith DD.** 2012. Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species. *New Phytologist* **193**, 713–720.
- Cochard H.** 2002. A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell and Environment* **25**, 815–819.
- Cochard H, Bréda N, Aussenac G, Granier A.** 1992. Vulnerability to air embolism of three european species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L). *Annals of Forest Science* **49**, 225–233.
- Cochard H, Coll L, Roux XL, Améglio T.** 2002. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiology* **128**, 282–290.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T.** 2005. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**, 410–418.
- Cruziat P, Cochard H, Améglio T.** 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science* **59**, 723–752.
- Dulin MW, Kirchoff BK.** 2010. Paedomorphosis, secondary woodiness, and insular woodiness in plants. *Botanical Review* **76**, 405–490.
- Farrokhi N, Burton R, Brownfield L, Hrmova M, Wilson SM, Bacic A, Fincher GB.** 2006. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 145–167.
- Flaishman MA, Loginovsky K, Lev-Yadun S.** 2003. Regenerative xylem in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 253–258.
- Groover AT.** 2005. What genes make a tree a tree? *Trends in Plant Science* **10**, 210–214.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L.** 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* **26**, 689–701.
- Haughn GW, Western TL.** 2012. *Arabidopsis* seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. *Frontiers in Plant Science* **3**, 1–5.
- Herbette S, Cochard H.** 2010. Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant Physiology* **153**, 1932–1939.
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, et al.** 2001. A transcriptional roadmap to wood formation. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA* **98**, 14732–14737.
- Jacobsen AL, Pratt RB, Tobin MF, Hacke UG, Ewers FW.** 2012. A global analysis of xylem vessel length in woody plants. *American journal of botany* **99**, 1583–91.
- Jansen S, Baas P, Gasson P, Lens F, Smets E.** 2004. Variation in xylem structure from tropics to tundra: evidence from vestured pits. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA* **101**, 8833–8837.
- Jansen S, Baas P, Gasson P, Smets E.** 2003. Vestured pits: do they promote safer water transport? *Journal of Experimental Botany* **164**, 405–413.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A.** 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**, 409–419.

- Jansen S, Pletsers A, Rabaey D, Lens F.** 2008. Vestured pits: a diagnostic character in the secondary xylem of myrtales. *Journal of Tropical Forest Science* **20**, 328–339.
- Kim J, Shiu SH, Thoma S, Li WH, Patterson SE.** 2006. Patterns of gene expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biology* **7**, R87.
- Ko JH, Han KH, Park S, Yang J.** 2004. Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiology* **135**, 1069–1083.
- Kocacinar F, Sage RF.** 2003. Photosynthetic pathway alters xylem structure and hydraulic function in herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* **26**, 2015–2026.
- Koizumi K, Yokoyama R, Nishitani K.** 2009. Mechanical load induces upregulation of transcripts for a set of genes implicated in secondary wall formation in the supporting tissue of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **122**, 651–659.
- Kolb KJ, Sperry JS.** 1999. Differences in drought adaptation between subspecies of sagebrush (*Artemisia tridentata*). *Ecology* **80**, 2373–2384.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D.** 2004. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 141–172.
- Lancashire JR, Ennos AR.** 2002. Modelling the hydrodynamic resistance of bordered pits. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1485–1493.
- Lamy JB, Bouffier L, Burrett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S.** 2011. Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PloS One* **6**, e23476.
- Lens F, Eeckhout S, Zwartjes R, Smets E, Janssens SB.** 2012a. The multiple fuzzy origins of woodiness within Balsaminaceae using an integrated approach. Where do we draw the line? *Annals of Botany* **109**, 783–799.
- Lens F, Smets E, Melzer S.** 2012b. Stem anatomy supports *Arabidopsis thaliana* as a model for insular woodiness. *New Phytologist* **193**, 12–17.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S.** 2011. Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist* **190**, 709–723.
- Lev-Yadun S.** 1994. Induction of sclereid differentiation in the pith of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1845–1849.
- Liepmann AH, Wightman R, Geshi N, Turner Simon R, Scheller HV.** 2010. *Arabidopsis*, a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal* **61**, 1107–1121.
- Maherali H, Walden AE, Husband BC.** 2009. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New Phytologist* **184**, 721–31.
- Mazur E, Kurczynska EU.** 2012. Rays, intrusive growth, and storied cambium in the inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Protoplasma* **249**, 217–220.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, et al.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**, 719–739.
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W.** 2001. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* **47**, 239–274.
- Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beeckman T.** 2008. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **40**, 1489–1492.
- Mencuccini M, Comstock J.** 1997. Vulnerability to cavitation in populations of two desert species, *Hymenoclea salsola* and *Ambrosia dumosa*, from different climatic regions. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1323–1334.
- Mencuccini M, Comstock J.** 1999. Variability in hydraulic architecture and gas exchange of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under well-watered conditions: interactions with leaf size. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 115–124.
- Meyre D, Leonardi A, Brisson G, Vartanian N.** 2001. Drought-adaptive mechanisms involved in the escape/tolerance strategies of *Arabidopsis Landsberg Erecta* and Columbia ecotypes and their F1 reciprocal progeny. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1145–1152.
- Micheli F.** 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6**, 414–419.
- Nieminen KM, Kauppinen L, Helariutta Y.** 2004. Update on xylem development a weed for wood? *Arabidopsis* as a genetic model. *Plant Physiology* **135**, 653–659.
- Pammenter NW, Vander Willigen C.** 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**, 589–593.
- Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ.** 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**, 267–277.
- Pigliucci M.** 2002. Ecology and evolutionary biology of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biology **1**, e0003.
- Pittermann J.** 2010. The evolution of water transport in plants: an integrated approach. *Geobiology* **8**, 112–139.
- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB.** 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 567–590.
- Rasband WS.** 1997–2012. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available at: <http://rsbweb.nih.gov/ij/> [accessed November 2011].
- Rosenthal DM, Stiller V, Sperry JS, Donovan L.** 2010. Contrasting drought tolerance strategies in two desert annuals of hybrid origin. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2769–2778.
- Rowe N, Paul-Victor C.** 2012. Herbs and secondary woodiness – keeping up the cambial habit. *New Phytologist* **193**, 3–5.
- Rowe N, Speck T.** 2005. Plant growth forms: an ecological and evolutionary perspective. *New Phytologist* **166**, 61–72.
- Sano Y, Morris H, Shimada H, Ronse De Craene LP, Jansen S.** 2011. Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Annals of Botany* **107**, 953–964.

- Sattler R, Rutishauser R.** 1997. The fundamental relevance of morphology and morphogenesis to plant research. *Annals of Botany* **80**, 571–582.
- Schweingruber FH.** 2006. Anatomical characteristics and ecological trends in the xylem and phloem of Brassicaceae and Resedaceae. *IAWA J* **27**, 419–442.
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A.** 2005. Cinnamyl alcohol dehydrogenase C and D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 2059–2076.
- Sibout R, Plantegenet S, Hardtke CS.** 2008. Flowering as a condition for xylem expansion in *Arabidopsis* hypocotyl and root. *Current Biology* **18**, 458–463.
- Sperry JS.** 2003. Evolution of water transport and xylem structure. *International Journal of Plant Sciences* **164**, 115–127.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT.** 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* **11**, 35–40.
- Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK.** 2005. Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant, Cell and Environment* **28**, 456–465.
- Sperry JS, Nichols K, Sullivan J, Eastlack S.** 1994. Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology* **75**, 1736–1752.
- Spicer R, Groover A.** 2010. Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytologist* **186**, 577–592.
- Telewski FW.** 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93**, 1466–1476.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Turner SR, Somerville CR.** 1997. Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *The Plant Cell* **9**, 689–701.
- Tyree MT, Zimmermann MH.** 2002. *Xylem structure and the ascent of sap*. New York: Springer-Verlag.
- Wheeler EA, Baas P, Rodgers S.** 2007. Variations in dicot wood anatomy: a global analysis based on the insidewood database. *IAWA J* **28**, 229–258.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N.** 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.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ.** 2007. An 'electronic fluorescent pictograph' browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Wolf S, Greiner S.** 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* **249**, 169–175.
- Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A, Gomory D, Roedel-Drevet P, Cochard H.** 2011. Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree Physiology* **31**, 1175–1182.
- Wyatt SE, Sederoff R, Flaishman MA, Lev-Yadun S.** 2010. *Arabidopsis thaliana* as a model for gelatinous fiber formation. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**, 363–367.
- Zhang J, Elo A, Helariutta Y.** 2011. *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology* **22**, 293–299.



Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies

Frederic Lens¹, Aude Tixier², Hervé Cochard², John S Sperry³, Steven Jansen⁴ and Stephane Herbette²

One adaptation of plants to cope with drought or frost stress is to develop wood that is able to withstand the formation and distribution of air bubbles (emboli) in its water conducting xylem cells under negative pressure. The ultrastructure of interconduit pits strongly affects drought-induced embolism resistance, but also mechanical properties of the xylem are involved. The first experimental evidence for a lower embolism resistance in stems of herbaceous plants compared to stems of their secondarily woody descendants further supports this mechanical-functional trade-off. An integrative approach combining (ultra)structural observations of the xylem, safety-efficiency aspects of the hydraulic pipeline, and xylem–phloem interactions will shed more light on the multiple adaptive strategies of embolism resistance in plants.

Addresses

¹ Naturalis Biodiversity Center, Leiden University, P.O. Box 9514, NL-2300 RA Leiden, The Netherlands

² INRA, UMR 547 PIAF, Clermont Université, Université Blaise Pascal, France

³ Biology Department, University of Utah, 257S, 1400E, Salt Lake City, UT 84112, USA

⁴ Institute for Systematic Botany and Ecology, Ulm University, Albert-Einstein Allee 11, D-89081 Ulm, Germany

Corresponding author: Lens, Frederic (frederic.lens@naturalis.nl)

Current Opinion in Plant Biology 2013, 16:287–292

This review comes from a themed issue on **Physiology and metabolism**

Edited by **John Browse** and **Edward Farmer**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 28th February 2013

1369-5266/\$ – see front matter, © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.005>

Introduction

According to the generally accepted cohesion-tension theory, capillary wicking of cell walls is the driving force in plants that creates a negative pressure, allowing transpiration to pull up water towards the leaves via a 3-D conduit network [1]. This negative pressure makes the liquid xylem sap metastable, and thus vulnerable to vaporization by cavitation [2]. Cavitated conduits may become air-filled or embolized, and can no longer transport water. Extensive embolism formation in the xylem can block most of the water flow, potentially leading to

branch sacrifice or even plant death [3–4]. Therefore, the resistance to drought or frost-induced embolism is an important adaptive trait for the growth and survival of plants [5,6,7**], evolving along with other strategies including rooting depth, leaf structure, shifts in biomass allocation, CAM metabolism, water storage and/or drought and frost avoidance.

This concise review describes how embolisms originate and spread into the conduit network, and highlights which mechanical properties of the xylem are involved in drought-induced embolism resistance. On the basis of original embolism measures in *Arabidopsis*, the mechanical-functional trade-offs may provide a novel additional explanation why some herbaceous flowering plant groups ‘reinvented’ wood development and turned again into the woody ancestral state (i.e. secondary woodiness).

Why and how do embolisms originate and spread into the xylem?

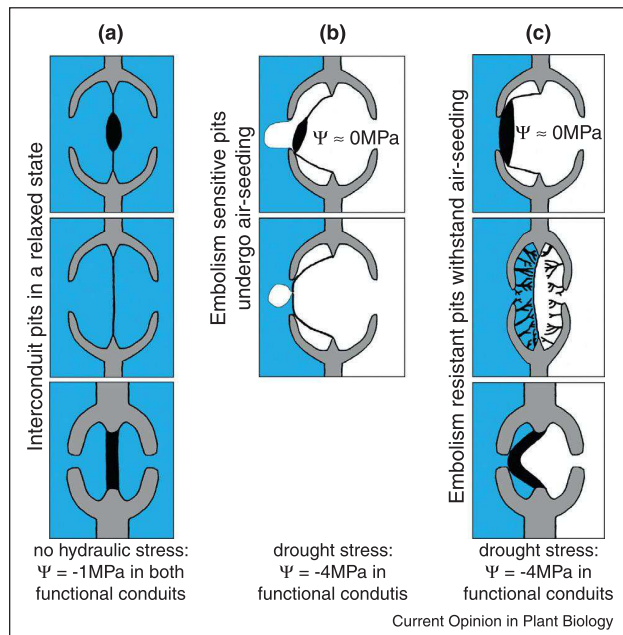
Vulnerable hydraulic pathway

When liquid water pressure drops below its saturated vapour pressure (2.3 kPa absolute at 20°C, or –99 kPa below atmospheric at sea level), it becomes metastable relative to the lower energy vapour phase [2]. As such, liquid water under negative pressure is vulnerable to cavitation: the abrupt phase change to vapour (cf. boiling). Spontaneous initiation of vapour bubbles in pure metastable water (homogenous nucleation) does not seem to be responsible for cavitation in plant xylem, because it occurs at pressures far more negative (between –30 and –140 MPa based on experimental measures [8]) than physiological xylem pressures (often between –0.1 and –10 MPa with exceptions to >–20 MPa [9–10]). Instead, xylem cavitation is likely heterogeneous, triggered by nucleating sites, which are most likely either small gas bubbles in conduits or water-conduit wall boundaries experiencing weaker adhesion forces [11].

Drought-induced embolism

Experimental evidence points to ‘air-seeding’ as an important cause of embolism by drought stress [2,11–12]. As more negative sap pressure develops during drought, air is aspirated into the functional conduit through porous sections of the conduit wall. Once inside the conduit, these air bubbles may seed the phase change to vapour, causing the negative sap pressure to rise abruptly to near atmospheric. The gas bubble then is

Figure 1



Fine-scale interconduit pit adaptations regulating drought-induced embolism in gymnosperms and angiosperms. Interconduit pits showing torus-margo pit membranes in gymnosperms (top row) and homogeneous pit membranes in angiosperms (middle and bottom rows). **(a)** Pit membranes in a relaxed state between two functional conduits facing no hydraulic stress. **(b)** and **(c)** A prolonged period of drought increases the pressure difference between the water-filled and the embolized conduit, causing the porous pit membranes to deflect. At a critical pressure difference, the capillary seal can give way, allowing air-seeding among adjacent conduits that exacerbates the water flow towards the leaves. Column c illustrates adaptations in pit quality characters that can prevent air-seeding at the same pressure difference, in comparison to the embolism sensitive pits shown in column b, such as the increased size ratio of tori versus pit aperture diameters in gymnosperms (top), and the presence of highly developed vestures (middle) or thicker pit membranes with reduced pores in angiosperms (bottom).

free to expand to fill the conduit and produce an embolism as water is drained by the surrounding transpiration stream. The evidence for air-seeding is that negative embolism pressures are usually equal and opposite to the pressure required to inject air into the intact conduits [13].

Important sites for air-seeding are openings in the secondary walls of neighbouring conduits called interconduit pits (Figure 1 [12]). These pits function to restrict the spread of air throughout the conduit network in the event of conduit damage, but at the same time allow lateral water transport via pores in the pit membranes (PMs). Conduits become damaged and air-filled not only during the course of normal development in the case of ruptured protoxylem strands, but also from abscission, breakage, herbivory, or other damage, although it remains to be

explored whether there are other causes for air-filled vessels. The nano-scale pores of the interconduit PMs are narrow enough to trap the meniscus against a substantial pressure difference between an embolized and a functional conduit, thus inhibiting air entry under normal conditions. But when the pressure difference becomes too large during drought, the capillary seal can give way, causing air-seeding through interconduit PMs (Figure 1b). In this way, embolism propagates from conduit to conduit. The amount of embolized cells can be measured in terms of loss of hydraulic conductivity at various negative pressures, resulting in so-called vulnerability curves (VCs, Figure 2). Since VCs measure embolism rates, and because not all cavitation events must necessarily lead to embolism formation, 'embolism resistance' is a more correct term for the commonly used 'cavitation resistance' in plant physiology.

Frost-induced embolism

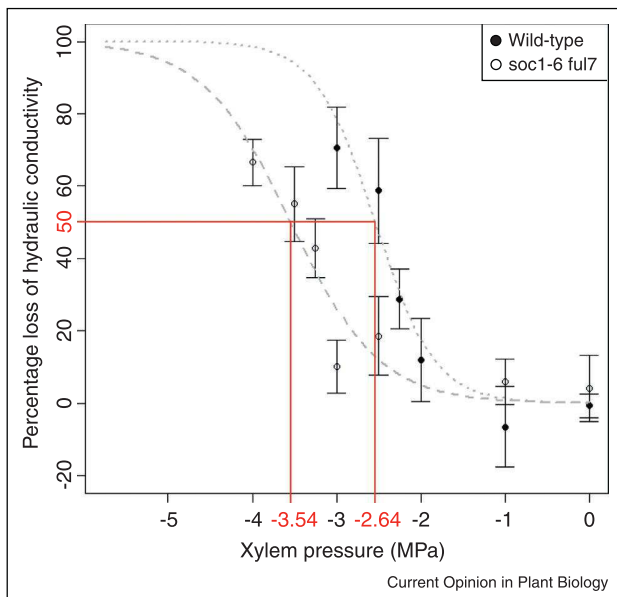
Embolism formation can also develop due to freeze-thaw cycles, and mainly depends on the diameter of the conduits [14–15]. Air is insoluble in ice, forming gas bubbles in the conduits during freezing. On thawing, these bubbles may expand when the negative pressure allows countering the bubble-collapsing force of the surface tension (thaw-expansion hypothesis). Consequently, frost-induced embolism can be amplified by drought stress [16–17].

Fine-scale interconduit pit adaptations regulate drought-induced embolism resistance

Mechanical behaviour of pit quality characters

Ultrastructural modifications of interconduit pits are good predictors to explain embolism resistance via air-seeding [18–22]. Within angiosperms, the huge variation in PM thickness (70–1900 nm) and maximum PM porosity (10–225 nm) show that species with thicker PMs have smaller PM pores and are better adapted to avoid air-seeding (Figure 1c bottom [19]). Thicker PMs are also presumed to be mechanically stronger, causing more resistance to stretching and preventing PM pores to become larger [18,24]. Likewise, narrower pit chambers [22,25] and vestured pits (Figure 1c middle [23]) prevent excessive PM deflection in some groups. The mechanical behaviour of pits and their PMs remains to be investigated thoroughly, and therefore also PM chemistry [26] needs special attention with reference to the pit type and developmental stage. Noncellulosic compounds, such as pectins and hemicelluloses, occur in gymnosperm PMs [27], but the chemical composition of angiosperm PMs seems to be more diverse [18,28–29]. According to recent studies, intervessel PMs contain little or no pectic homogalacturonans and rhamnogalacturonan-I [29–30], which raises serious doubts about the swelling/shrinking hypothesis of interconduit PMs related to the ionic effect [31–34].

Figure 2



Xylem vulnerability to embolism in *Arabidopsis thaliana* wild-type (WT) and the woody *soc1-6 ful7* mutant. Vulnerability curves of the WT (closed circles) and the mutant (open circles) show a significant difference (Student's *t*-test, $P < 0.05$). The P50, or the pressure inducing 50% loss of hydraulic conductivity due to embolism formation, corresponds to -3.54 MPa in the woody mutant stems versus -2.64 MPa in the WT stems (red lines). Plants were grown under long days (16 hours light per day). Each data point represents the mean value from two to four plants and bars represent standard errors. Dotted grey lines are sigmoidal regressions.

Within conifers, embolism resistance of torus-margo pits in unicellular tracheids seems most closely correlated to the size ratio of torus versus pit aperture diameter [20–21,25]. This suggests that the adhesion of the torus to the pit border is a major determinant of drought-induced embolism resistance (seal capillary-seeding, Figure 1c top [20]), although some conifer species show plasmodesmatal pores in their tori assuming air-seeding through these tori pores [35].

Pit quantity characters

The chance of initiating air-seeding through a single PM with large pores appears to be larger when more intervessel pits per vessel are present (rare pit hypothesis [36]). However, while the link between pit quantity per vessel and vulnerability to embolism is demonstrated in some angiosperm groups [37], it is lacking in others [22]. Opponents of the rare pit hypothesis use the quantity of intervessel pits per vessel to explain why long-vessel species usually show vulnerable embolism rates [37–38]. The vulnerability of large vessels, however, is the subject of contradictory opinions. For instance, recent studies in grapevine based on a wide range of traditional and up-to-date *in vivo* techniques suggest that the high embolism

ratios in long-vessel species may be a typical problem of the commonly used centrifuge technique [39–41], while others finding no long-vessel artefact [42].

More evidence for the mechanical-functional trade-off in xylem

Wood density and thickness-to-span ratio

Embolism resistant species are often characterized by a high wood density and a high thickness-to-span ratio of water conducting cells [43–45], and some studies have also highlighted increased fibre wall area, Modulus of Elasticity, and Modulus of Rupture as additional trade-offs [44]. The mechanical reinforcement in drought-induced embolism resistant wood is often explained by the stronger negative pressures in the conduits. Nevertheless, conduit implosion due to negative pressures has never been observed in wood. Alternatively, conduit wall reinforcement might prevent microfractures in walls [44] that in turn might trigger heterogeneous nucleation from air particles in walls or in intercellular spaces. But again, there is no experimental evidence for these microfractures, leaving the underlying mechanisms for the mechanical-functional trade-off in the xylem tissue unresolved.

A new additional evolutionary hypothesis for secondary woodiness

The existing mechanical-functional correlation in xylem can be translated into a novel hypothesis explaining why the habit shift from herbaceousness towards *secondary woodiness* (SW) occurs in some angiosperms. This habit shift was initially observed on islands by Charles Darwin and described as *insular woodiness* [46]. Today, several hypotheses are raised explaining why herbaceous lineages undergo massive convergent evolutionary shifts towards SW shrubs (summarized in [47]), but compelling evidence for this increased woodiness remains absent. Our Canary Island review shows that many of the SW species are native to the markedly dry coastal regions, suggesting for the first time a link between increased woodiness and embolism resistance [48[•]]. However, we want to emphasize that many SW lineages also occur in very wet environments, suggesting the involvement of multiple environmental factors. For instance, lack of frost is an important criterion influencing the occurrence of SW [49].

Embolism measures in herbaceous species are scarce because of their fragile stems. Not surprisingly, the few herbaceous species studied do have rigid stems, such as corn [50] and bamboos [51[•]]. Recently, Tixier *et al.* [52[•]] have managed to reconstruct VCs from the fragile herbaceous *Arabidopsis thaliana* stems. They demonstrate that short-day plants with slightly more wood development at the base of their stems are significantly more embolism resistant than long-day plants with less wood development, supporting the above-mentioned trade-off. We go one step further and compare the herbaceous wild-type

with the shrubby *A. thaliana* mutant [53,54[•]]. The VCs of the woody mutant stems show significantly lower embolism rates than VCs of the herbaceous accession grown under the same growth conditions (Figure 2). This is the first experimental evidence supporting increased embolism resistance in SW shrubs compared to their herbaceous relatives.

Different strategies in embolism resistance between angiosperms and gymnosperms

High risk versus safety

Angiosperms and gymnosperms have a strikingly different strategy to cope with drought-induced embolism resistance: the majority of angiosperms show a risky behaviour and operate close to their lethal hydraulic limit (i.e. pressure resulting in 70–80% loss of conductivity), while most of the gymnosperms develop a much safer hydraulic margin that is further away from their lethal 50% boundary [3,4,7^{••}]. The greater ability of angiosperms versus gymnosperms to repair stem embolisms may partly explain this different strategy [55[•]].

Refilling embolized conduits

Positive xylem pressures have been linked to vessel refilling in a variety of angiosperms, such as temperate woody trees [56], woody tropical plants [57], and many herbaceous species [51[•]]. Refilling has also been reported under negative pressures, for instance in bay laurel [58] and rice [59], and requires pressures that need to rise close to atmospheric levels while the bulk xylem remains under negative pressure [60]. This seems contradictory, but what we do know is that sugars and ions from living xylem and phloem cells are involved [58,60–61]. This is demonstrated by amongst others girdling experiments [38,58] and the observed transport of water and solutes between phloem and xylem [62].

Conclusion and future prospectives

Various structure–function relationships in the xylem are known to play a role in embolism resistance. Pit membrane thickness and porosity are crucial to prevent drought-induced embolism via air-seeding, and more insights into PM composition in different cell types in the xylem of angiosperms are urgently desired to understand the interaction between the dead conduits and the living cells. Emphasis is also placed on trade-offs between mechanical wood properties and embolism resistance, and is further supported by original embolism measures showing that stems of secondarily woody *Arabidopsis* mutants are more embolism resistant than the ones of the herbaceous wild-type.

The self-regulation of water flow (ionic effect) and refilling of embolized conduits suggest that water transport does not entirely rely on a passive cohesion-tension process, but also requires input from living cells. Future

research should focus on these refilling mechanisms, and continue to elaborate on a broad-scale integrative approach linking xylem and phloem physiology with in-depth anatomy of the hydraulic pathway [63[•]]. Existing database projects, such as TRY [64] and the Xylem Functional Traits database [7^{••}], are the necessary first steps to accomplish this effort. Once we know the crucial features characterizing embolism formation and refilling in plants, we can find and manipulate the genes underlying these characters using woody model species [65] and apply it to tree forest species. A global analysis on the vulnerability of forests to drought shows that many trees operate with narrow hydraulic safety margins, inferring that embolism-related research will become increasingly important under the current Climate Change predictions [7^{••}].

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This research was funded in part by the PitBulles project (ANR no 2012 Blan 171001 to HC and SH), and a NSF-IBN-0743148 project granted to JSS.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Dixon H, Joly J: **On the ascent of sap.** *Ann Bot (Lond)* 1894, **8**:468–470.
 2. Steudle E: **The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots.** *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* 2001, **52**:847–875.
 3. Brodribb TJ, Bowman D, Nichols S, Delzon S, Burtlett R: **Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit.** *New Phytol* 2010, **188**:533–542.
 4. Anderegg WRL, Berry JA, Smith DA, Sperry JS, Anderegg LDL, Field CB: **The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**:233–237.
 5. Brodribb TJ, Cochard H: **Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers.** *Plant Physiol* 2009, **149**:575–584.
 6. Kursar TA, Engelbrecht BMJ, Burke A, Tyree MT, El Omari B, Giraldo JP: **Tolerance to low leaf water potential status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution.** *Funct Ecol* 2009, **23**:93–102.
 7. Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci S, Feild TS, Gleason SM, Hacke U *et al.*: **Global convergence in the vulnerability of forests to drought.** *Nature* 2012, **491**:752–756.
- A global analysis on the vulnerability to drought in 266 forest species worldwide shows that most species operate with narrow hydraulic safety margins. These margins are largely independent from current mean annual precipitation.
8. Caupin F, Arvengas A, Davitt K, Azouzi MEM, Shmulovich KI, Ramboz C, Sessoms DA, Stroock AD: **Exploring water and other liquids at negative pressure.** *J Phys Condens Matter* 2012, **24**:284110.

9. Maherali H, Pockman WT, Jackson RB: **Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation.** *Ecology* 2004, **85**:2184-2199.
10. Willson CJ, Manos PS, Jackson RB: **Hydraulic traits are influenced by phylogenetic history in the drought-resistant, invasive genus *Juniperus* (Cupressaceae).** *Am J Bot* 2008, **95**:299-314.
11. Cochard H: **Cavitation in trees.** *C R Physique* 2006, **7**:1018-1026.
12. Zimmermann MH: *Xylem Structure and the Ascent of Sap.* Springer; 1983.
13. Cochard H, Cruziat P, Tyree MT: **Use of positive pressures to establish vulnerability curves: further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis.** *Plant Physiol* 1992, **100**:205-209.
14. Davis SD, Sperry JS, Hacke UG: **The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing.** *Am J Bot* 1999, **86**:1367-1372.
15. Pittermann J, Sperry JS: **Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers.** *Tree Physiol* 2003, **23**:907-914.
16. Pittermann J, Sperry JS: **Analysis of freeze-thaw embolism in conifers. The interaction between cavitation pressure and tracheid size.** *Plant Physiol* 2006, **140**:374-382.
17. Mayr S, Sperry JS: **Freeze-thaw induced embolism in *Pinus contorta*: centrifuge experiments validate the 'thaw-expansion hypothesis' but conflict with ultrasonic emission data.** *New Phytol* 2010, **185**:1016-1024.
18. Choat B, Cobb A, Jansen S: **Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole plant hydraulic function.** *New Phytol* 2008, **177**:608-626.
19. Jansen S, Choat B, Pletsers A: **Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms.** *Am J Bot* 2009, **96**:409-419.
20. Delzon S, Douthe C, Sala A, Cochard H: **Mechanism of water-stress-induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal-capillary seeding.** *Plant Cell Environ* 2010, **33**:2101-2111.
21. Pittermann J, Choat B, Jansen S, Stuart SA, Lynn L, Dawson T: **The relationships between xylem safety and hydraulic efficiency in the Cupressaceae: the evolution of pit membrane form and function.** *Plant Physiol* 2010, **153**:1919-1931.
22. Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S: **Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*.** *New Phytol* 2011, **190**:709-723.
23. Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM: **Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vested pits.** *J Exp Bot* 2004, **55**:1569-1575.
24. Sperry JS, Hacke U: **Analysis of circular bordered pit function. I. Angiosperm vessels with homogeneous pit membranes.** *Am J Bot* 2004, **91**:369-385.
25. Hacke UG, Jansen S: **Embolism resistance of three boreal conifer species varies with pit structure.** *New Phytol* 2009, **182**:675-686.
26. Herbette S, Cochard H: **Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation.** *Plant Physiol* 2010, **153**:1932-1939.
27. Bauch J, Liese W, Scholz F: **Über die Entwicklung und stoffliche Zusammensetzung der Hoptüpfelmembranen von Längstracheiden in Coniferen.** *Holzforschung* 1968, **22**:144-153.
28. Gortan E, Nardini A, Salleo S, Jansen S: **Pit membrane chemistry influences the magnitude of ion-mediated enhancement of xylem hydraulic conductivity in four Lauraceae.** *Tree Physiol* 2011, **31**:48-58.
29. Plavcová L, Hacke UG: **Heterogenous distribution of pectin epitopes and calcium in different pit types of four angiosperm species.** *New Phytol* 2011, **192**:885-897.
30. Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS: **Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation.** *Plant Cell Environ* 2011, **34**:501-513.
31. Zwieniecki MA, Melcher PJ, Holbrook NM: **Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants.** *Science* 2001, **291**:1059-1062.
32. van Ieperen W: **Ion-mediated changes of xylem hydraulic resistance in plants: fact or fiction?** *Trends Plant Sci* 2007, **12**:137-142.
33. Jansen S, Gortan E, Lens F, Lo Gullo MA, Trifiò P, Scholz A, Salleo S, Stein A, Nardini A: **Do quantitative vessel and pit characters account for ion-mediated changes in the hydraulic conductance of xylem across angiosperms?** *New Phytol* 2011, **189**:218-228.
34. Nardini A, Salleo S, Jansen S: **More than just a vulnerable pipeline: xylem physiology in the light of ion-mediated regulation of plant water transport.** *J Exp Bot* 2011, **62**:4701-4718.
35. Jansen S, Lamy J-B, Burlett R, Cochard H, Gasson P, Delzon S: **Plasmodesmatal pores in the torus of bordered pit membranes affect cavitation resistance of conifer xylem.** *Plant Cell Environ* 2012, **35**:1109-1120.
36. Christman MA, Sperry JS, Adler FR: **Testing the 'rare pit' hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*.** *New Phytol* 2009, **182**:664-674.
37. Hacke U, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L: **Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency.** *Tree Physiol* 2006, **26**:689-701.
38. Christman MA, Sperry JS, Smith DD: **Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species.** *New Phytol* 2012, **193**:713-720.
39. Choat B, Drayton WM, Brodersen C, Matthews MA, Shackel KA, Wada H, McElrone AJ: **Measurement of vulnerability to water stress-induced cavitation in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long-vesseled species.** *Plant Cell Environ* 2010, **33**:1502-1512.
40. Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews MA, Shackel KA: **The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography.** *Plant Physiol* 2010, **154**:1088-1095.
41. McElrone AJ, Brodersen CR, Alsina MM, Drayton WM, Matthews MA, Shackel KA, Wada H, Zufferey V, Choat B: **Centrifuge techniques consistently overestimates vulnerability to water stress-induced cavitation in grapevines as confirmed with high-resolution computed tomography.** *New Phytol* 2012, **196**:661-665.
42. Jacobsen AL, Pratt RB: **No evidence for an open vessel effect in centrifuge-based vulnerability curves of a long-vesseled liana (*Vitis vinifera*).** *New Phytol* 2012, **194**:982-990.
43. Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA: **Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure.** *Oecologia* 2001, **126**:457-461.
44. Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Paddock WAIII, Davis SD: **Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance?** *Plant Physiol* 2005, **139**:546-556.
45. Chave J, Comes D, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE: **Towards a worldwide wood economics spectrum.** *Ecol Lett* 2009, **12**:351-366.
46. Darwin C: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection.* John Murray; 1859.
47. Whittaker RJ, Fernández-Palacios LM: *Island Biogeography.* edn 2. Oxford University Press; 2010.
48. Lens F, Davin N, Smets E, Del Arco M: **Insular woodiness on the • Canary Islands: remarkable cases of parallel evolution.** *Int J Plant Sci*, in press
This is the first comprehensive review dealing with the origin of woodiness of a particular region using data from wood anatomy and molecular phylogenetic studies. In total, 220 native insular woody species from

15 families are found on the Canary Islands, of which most of them grow in the dry coastal regions.

49. Carlquist S: *Island Biology*. Columbia University Press; 1974.
50. Li Y, Sperry JS, Shao M: **Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance**. *Environ Exp Bot* 2009, **66**:341-346.
51. Cao K-F, Yang S-J, Zhang Y-J, Brodribb TJ: **The maximum height of grasses is determined by roots**. *Ecol Lett* 2012, **15**:666-672.
The maximum heights of bamboo culms are closely predicted by the maximum measured root pressure overnight. The authors also demonstrate that water transport in these species is dependent on root pressure to repair hydraulic dysfunction.
52. Tixier A, Cochard H, Badel E, Dusotoit-Coucaud A, Jansen S, Herbette S: ***Arabidopsis thaliana* as a model species for xylem hydraulics: does size matter?** *J Exp Bot*, submitted for publication
This paper provides for the first time VCs of the herbaceous model *Arabidopsis thaliana*, showing that short-day plants producing more wood cells at the base of the stem are more embolism resistant than the long-day plants. This supports the view that *Arabidopsis* can be used as a new model for xylem hydraulics.
53. Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rhode A, Beeckman T: **Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis***. *Nat Gen* 2008, **40**:1489-1492.
54. Lens F, Smets E, Melzer S: **Stem anatomy supports *Arabidopsis thaliana* as a model for insular woodiness**. *New Phytol* 2012, **193**:12-17.
Wood anatomy of the double mutant of *Arabidopsis* agrees with other woody Brassicaceae that develop into shrubs in their natural environment. This offers new opportunities to use this woody phenotype as a new model to investigate the molecular pathway leading to wood formation.
55. Johnson DM, McCulloh KA, Woodruff DR, Meinzer FC: **Hydraulic safety margins an embolism reversal in stems and leaves: why are conifers and angiosperms so different?** *Plant Sci* 2012, **195**:48-53.
Conifer stems have greater hydraulic safety margins than those of angiosperms. On the other hand, leaves and roots of conifers embolize and refill more frequently than those of angiosperms, which could be related to low stomatal sensitivity and/or a lesser ability of conifers to repair stem embolisms.
56. Ewers FW, Améglio T, Cochard H, Beaujard F, Martignac M, Vandame M, Bodet C, Cruiziat P: **Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures**. *Tree Physiol* 2001, **21**:1123-1132.
57. Fisher J, Angeles G, Ewers FW, López-Portillo J: **Survey of root pressure in tropical vines and woody species**. *Int J Plant Sci* 1997, **158**:44-50.
58. Salleo S, LoGullo MA, Trifilo P, Nardini A: **New evidence for a role of vessel-associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitared stems of *Laurus nobilis* L.** *Plant Cell Environ* 2004, **27**:1065-1076.
59. Stiller V, Sperry JS, Lafitte R: **Embolized conduits of rice (*Oryza sativa*, Poaceae) refill despite negative xylem pressure**. *Am J Bot* 2005, **92**:1970-1974.
60. Zwieniecki MA, Holbrook NM.: **Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair**. *Trends Plant Sci* 2009, **14**:530-534.
61. Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S: **Refilling embolized xylem conduits: is it a matter of phloem unloading?** *Plant Sci* 2011, **180**:604-611.
62. Metzner R, Thorpe MR, Breuer U, Blümmler P, Schurr U, Schneider HU, Schroeder WH: **Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo-SIMS**. *Plant Cell Environ* 2010, **33**:1393-1407.
63. Carlquist S: **How wood evolves: a new synthesis**. *Botany* 2012, **90**:901-940.
This review presents a total evidence approach providing an up-to-date summary about the evolution of wood anatomical features embedded in an eco-physiological context.
64. Kattge J, Diaz S, Lavorel S, Prentice IC, Leadley P, Bönlisch G, Garnier E, Westoby M, Reich PB, Wright IJ *et al.*: **TRY – a global database of plant traits**. *Global Change Biol* 2011, **17**:2905-2935.
65. Secchi F, Gilbert ME, Zwieniecki MA: **Transcriptome response to embolism formation in stems of *Populus trichocarpa* provides insights into signaling and the biology of refilling**. *Plant Physiol* 2011, **157**:1419-1429.

DISCUSSION GENERALE

ROLE DE L'ULTRASTRUCTURE DE LA PONCTUATION

Mise en évidence de l'importance des déformations

Rôle de chacune des dimensions de la ponctuation

Perspectives

PROPRIETES INTRINSEQUES DE LA MEMBRANE

Propriétés physiques

Composition de la membrane

BASES MOLECULAIRES DE LA VULNERABILITE A LA CAVITATION

Pertinence de l'approche gène candidat

Rôle des pectines et des PG dans la vulnérabilité à la cavitation

Perspectives

CONCLUSION GENERALE

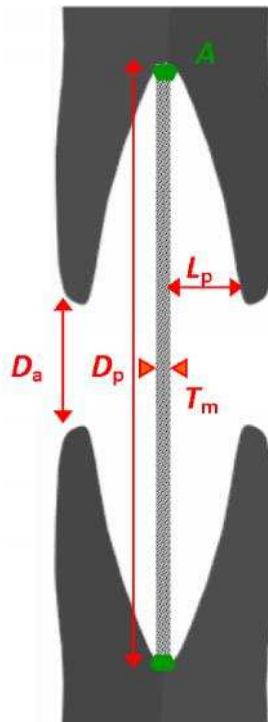


Figure 52 : Schéma d'une ponctuation observée en coupe transversale. La ligne grise représente la membrane qui est encadrée au niveau de l'anneau (A, vert). Les abréviations des dimensions de la ponctuation sont représentées en rouge. T_m : épaisseur de membrane, L_p : profondeur de la chambre de ponctuation, D_p : diamètre de la chambre de ponctuation, D_a : Diamètre de l'ouverture de la ponctuation.

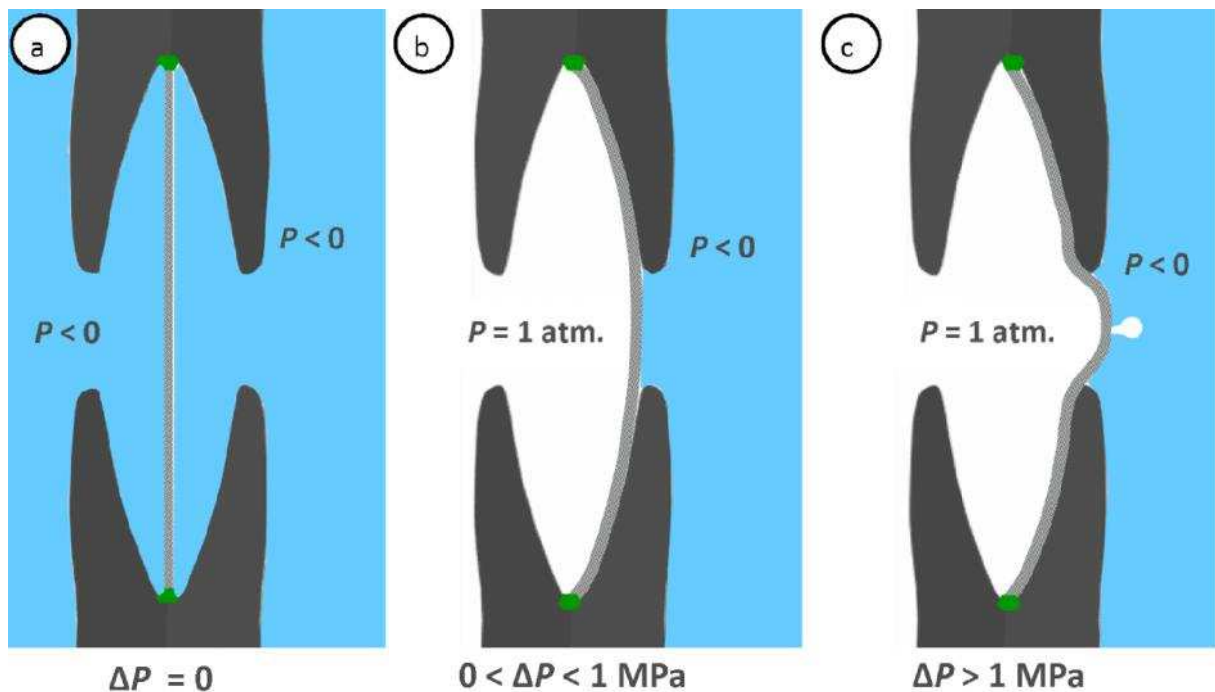


Figure 53 : Comportement de la membrane de ponctuation soumis à une différence de pression. L'aspiration de la membrane contre l'ouverture de la ponctuation surviendrait pour des différences de pressions inférieures à 1 MPa (b) et le germe d'air se produirait après aspiration pour des différences de pression plus grandes (c).

I ROLE DE L'ULTRASTRUCTURE DE LA PONCTUATION

Nous proposons un modèle mécanique de comportement de la membrane de ponctuation lorsqu'elle est soumise à une différence de pression, c'est-à-dire lorsqu'elle sépare un vaisseau fonctionnel sous tension et un vaisseau embolisé sous pression atmosphérique. Le modèle utilisé considère une plaque fine encastrée selon la théorie des plaques minces de Kirchhoff-Love. Nous mettons en évidence que les membranes des ponctuations subissent des déformations lorsqu'elles sont soumises à une différence de pression. La déformation d'une membrane aurait un effet sur le germe d'air par l'agrandissement de pores existants ou la création de microfractures. La déformation des pores existants expliquerait l'écart entre les pores mesurés par des approches de microscopie électronique et les pores calculés pour induire la cavitation à une pression donnée selon la loi de Laplace (Jansen et al., 2009).

Les déformations subies par la membrane sont conditionnées par les propriétés mécaniques intrinsèques de la membrane mais aussi par la géométrie de la chambre de la ponctuation (Figure 52). Ce modèle permet d'isoler la composante géométrique de la qualité des ponctuations. Il quantifie : i) l'effet d'une pression sur les déformations de la membrane, ii) la pression nécessaire à plaquer cette membrane contre les bordures de la ponctuation et iii) le comportement de la membrane après aspiration contre les bordures. La comparaison des sorties du modèle pour différentes espèces avec des vulnérabilités à la cavitation permet de tester si le comportement mécanique de la membrane de la ponctuation a une incidence sur la vulnérabilité à la cavitation. D'autre part, nous avons réalisé des expériences de micromoulages de ponctuations à différentes pressions sur le peuplier dont le module d'Young des membranes était mesuré. La comparaison des déformations calculées avec les déformations mesurées sur micro-moulages permet de tester le modèle. Ces expériences sont réalisées en collaboration avec Marie Capron, doctorante à IFMT.

1) Mise en évidence de l'importance des déformations

L'analyse de la géométrie des ponctuations de plusieurs espèces d'angiospermes (1^{ier} chapitre de cette thèse) montre que la variabilité des dimensions des ponctuations est à l'origine d'une grande variabilité de déformations pour une pression donnée. Cette variabilité de déformations a été corrélée à une variabilité de la vulnérabilité à la cavitation des espèces. Les événements de cavitation auraient lieu bien après que la membrane soit aspirée contre les bordures de la chambre (Figure 53). L'aspiration de la membrane surviendrait pour des pressions faibles (< 1 MPa). Néanmoins, les déformations expérimentées à l'intérieur de la chambre ne doivent pas être négligées. Elles conditionnent le niveau de déformation après aspiration, et elles sont plus grandes.

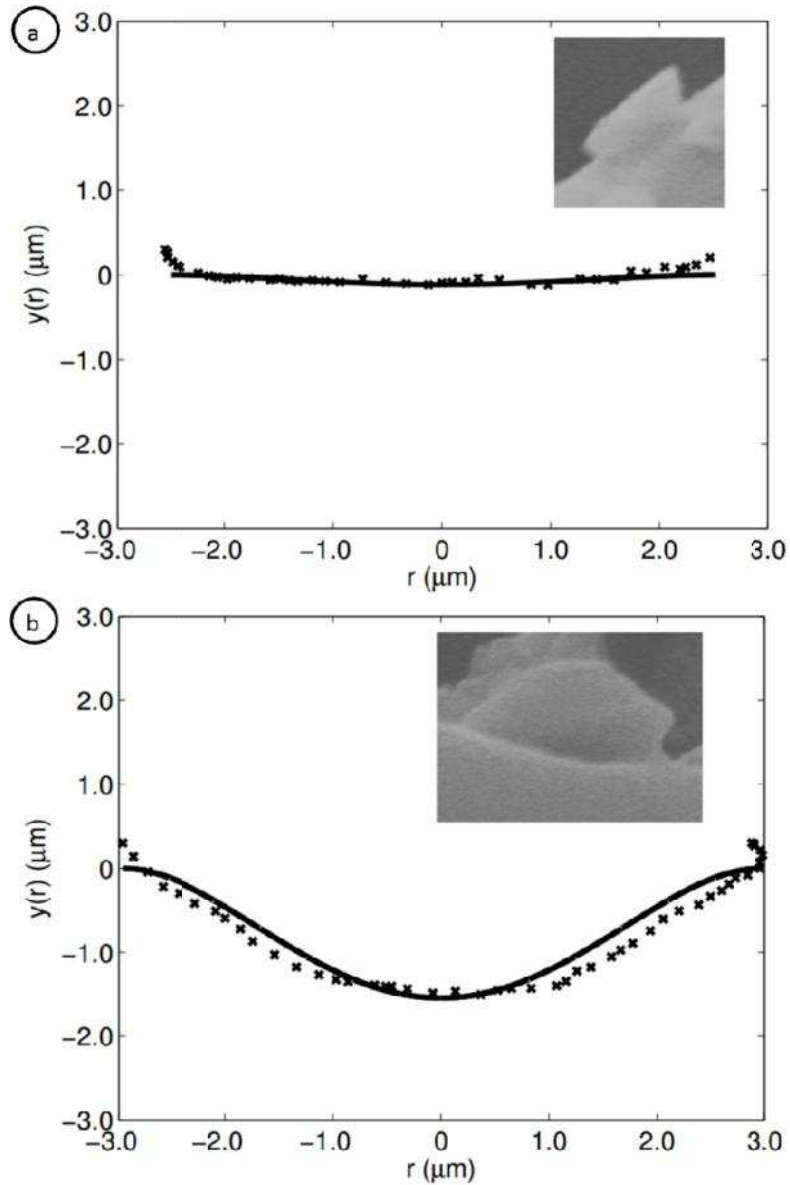


Figure 54 : Comportement de la membrane des punctuations testé expérimentalement et par le modèle mécanique. Pour analyser expérimentalement le comportement d'une membrane, du silicone est injecté dans des rameaux de *Populus detoides x nigra* sous 2bars (a) et 22 bars (b), des pressions induisant respectivement 0 et 70 % d'embolie. Les tissus sont ensuite digérés puis les moulages de punctuations observés au MEB. Les longueurs de membranes sont mesurés dans un plan passant par leur diamètre avec r le rayon et y la déflexion de la membrane. La déformation observée (points) est comparée aux déformations calculées par le modèle (ligne pleine).

Le niveau de déformation après aspiration est plus faible car le modèle considère que seule la portion de membrane non retenue par les bordures est soumise à des déformations après aspiration. Le Module de Young des membranes de ponctuation de l'espèce *Populus deltoïdes x nigra* avait été mesuré avec un microscope à force atomique (AFM) à l'IFMT. Des micromoulages des ponctuations de cette espèce ont ensuite été réalisés selon le protocole décrit en Annexe 10 (Figure 54). Un élastomère de silicone est injecté dans des segments de branches. Il est injecté à des pressions de 2, 18 et 22 bars qui induisent des niveaux contrastés de PLC pour cette espèce (0, 35 et 70 %, respectivement). Le silicone est un élastomère qui traverse les ouvertures des ponctuations mais pas leurs membranes (Sperry et al., 2005). L'injection à différentes pressions permet donc de rendre compte des niveaux de déformation des membranes de ponctuations soumises à une pression. Après polymérisation du silicone, les tissus végétaux sont dégradés et les moulages observés en MEB. Les déformations sont alors mesurées puis comparées aux déformations calculées par le modèle (Figure 52). Les profils de déformation observés et les modules d'Young calculés correspondent respectivement aux déformations modélisées et au Module d'Young mesuré par AFM. Le comportement modélisé est donc représentatif des ponctuations soumises à une différence de pression.

2) Rôle de chacune des dimensions de la ponctuation

Ce modèle offre aussi la possibilité d'appréhender chacune des dimensions de la ponctuation et de déterminer ainsi leurs contributions respectives dans les déformations subies (Figure 55). Une diminution de la profondeur de la chambre diminue la pression nécessaire à plaquer la membrane contre les bordures et ainsi le niveau de déformations expérimentées lors de l'aspiration. Après aspiration, la relation déformation/pression demeure inchangée car strictement dépendante de l'épaisseur et du diamètre de l'aperture. Une diminution de la profondeur de chambre entraîne donc des niveaux de déformation inférieurs pour des hautes pressions. Une augmentation de l'épaisseur de la membrane de la ponctuation augmente sa rigidité de flexion, qui augmente la valeur de pression nécessaire à l'aspiration de la membrane contre les bordures, avec des niveaux de déformation plus grands. En revanche, l'augmentation de la rigidité de flexion influera inversement la relation déformation/pression après aspiration. Pour des niveaux de pression plus élevés (ex 2 MPa chez *Fagus sylvatica*) les niveaux de déformation sont donc diminués. Une augmentation du diamètre de la chambre conduit à une valeur de pression nécessaire à l'aspiration de la membrane plus faible pour des niveaux de déformations diminués. Après aspiration, la relation déformation/pression demeure inchangée et les niveaux de déformation expérimentés pour des hautes pressions sont donc inférieurs. Une augmentation de diamètre de l'ouverture de la ponctuation affecte la relation déformation/pression après aspiration. Ainsi pour des différences de

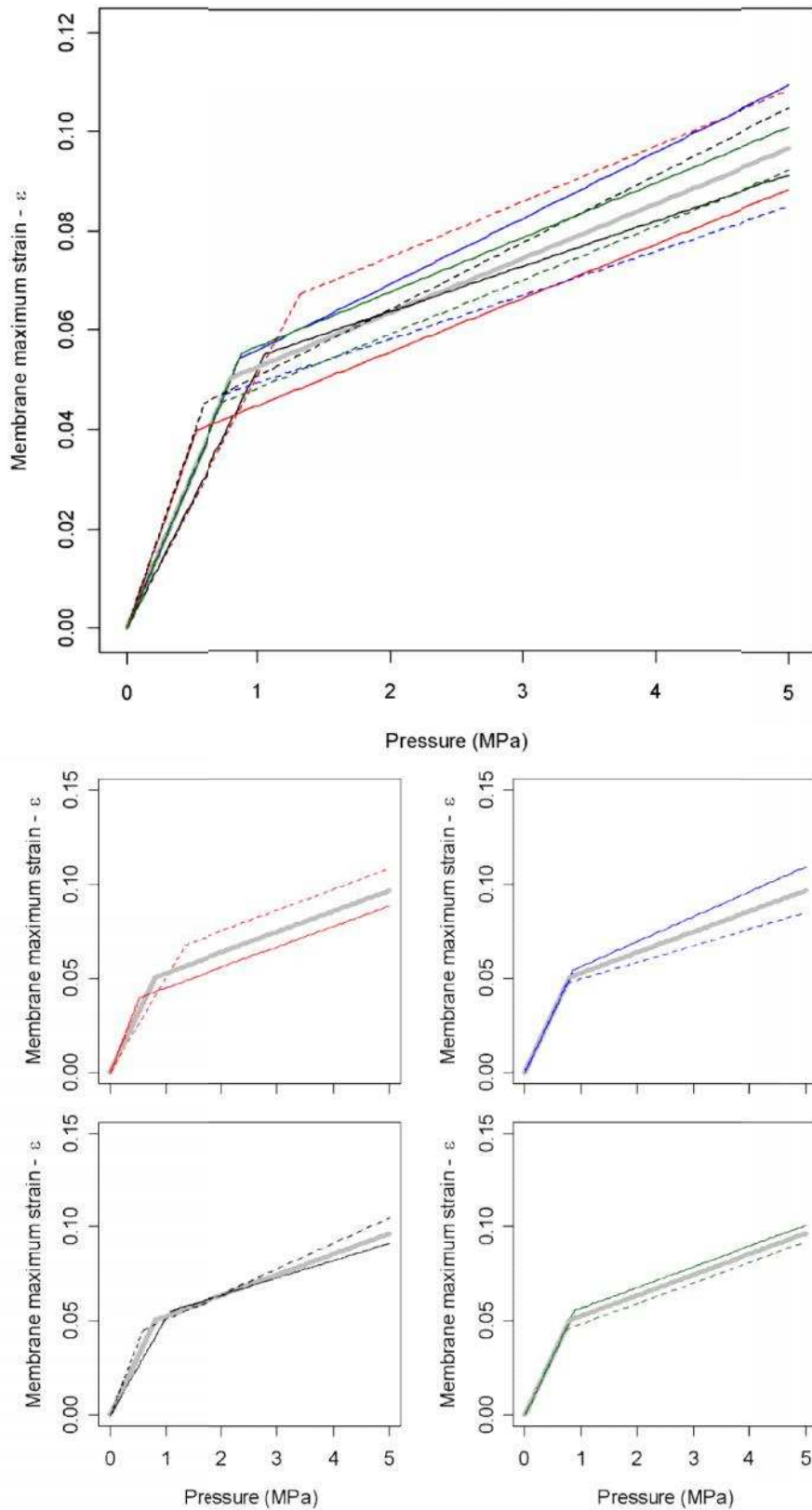


Figure 55 : Contributions des dimensions d'une ponctuation aux déformations de sa membrane chez *Fagus sylvatica*. Les valeurs mesurées du diamètre de la membrane (rouge), du diamètre de l'aperture (bleu), de l'épaisseur de membrane (noir) et de la profondeur de chambre (vert) sont augmentées (traits pleins) ou diminuées (tirets) de 10%. Les déformations sont alors calculées avec ces variations de dimensions puis comparées aux valeurs de déformations de référence (trait gris).

pression élevées, les niveaux de déformation seront augmentés.

D'après le modèle, le diamètre de la ponctuation est la dimension dont les variations auraient le plus d'effet sur les déformations subies par la membrane et donc sur la vulnérabilité à la cavitation. Au delà d'une certaine pression (3.5 MPa chez *Fagus sylvatica*), c'est une variation de diamètre de l'ouverture qui a un effet prépondérant sur les déformations de la membrane. Pourtant, les corrélations entre ces deux dimensions des ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation tendent à être faibles à l'échelle interspécifique (Lens et al., 2011; Scholz et al., 2013). Des corrélations importantes sont observées entre l'épaisseur de la membrane, la profondeur de chambre et la vulnérabilité à la cavitation. Une explication alternative de la corrélation entre l'épaisseur de la membrane et la vulnérabilité à la cavitation pourrait être que cette corrélation est indirecte. L'épaisseur de membrane serait liée à l'épaisseur des parois de vaisseaux (Schmitz et al., 2007). Or, l'augmentation de l'épaisseur des parois des cellules du bois serait associée à une résistance au collapse pour des tensions du xylème plus grandes (Hacke et al., 2001; Jacobsen et al., 2005)

A l'échelle intraspécifique, des peupliers acclimatés à un régime hydrique contraignant, et avec des vulnérabilités à la cavitation plus faibles que les plantes témoins, montrent des ponctuations avec un diamètre à peine plus faible (Awad, 2011). Ce résultat est à l'encontre des résultats du modèle. La géométrie de la ponctuation conditionne effectivement les déformations décrite par notre modèle mais elle influe aussi sur d'autres paramètres des ponctuations qui influeraient sur la vulnérabilité à la cavitation. Ainsi, la diminution de diamètre de ponctuation peut diminuer l'aire de ponctuation et ainsi la probabilité de germe d'air selon la théorie de la ponctuation rare. De plus le modèle ne prend pas en compte les potentielles modifications de porosités de la membrane inhérentes à une modification de leur morphologie. Lors de la biosynthèse d'une ponctuation, il est possible que l'agencement des microfibrilles de cellulose conditionnant la porosité soit défini en partie par la taille finale de la membrane. Une réduction de la taille d'une ponctuation pourrait être indépendante du nombre de microfibrilles présentes dans la membrane. En diminuant la surface de membrane de ponctuation, le diamètre moyen des pores serait alors diminué.

La géométrie de la chambre est probablement contrainte par d'autres fonctions du xylème, en particulier sa résistance mécanique à la tension de sève et son efficacité à transporter la sève (Sperry, 2003; Sperry and Hacke, 2004). D'une part, des vaisseaux avec des ponctuations de plus grands diamètres représentent des structures mécaniquement moins résistantes donc plus fragilisées en regard du collapse (Carlquist, 2001). D'autre part, les variations de morphologie de ponctuation affectent probablement leur résistance hydraulique (Choat et al., 2006). Une diminution de l'ouverture de la ponctuation ou de l'épaisseur de sa membrane diminue sa conductance. Les fortes corrélations entre les paramètres d'épaisseur de membrane et de profondeur de chambre

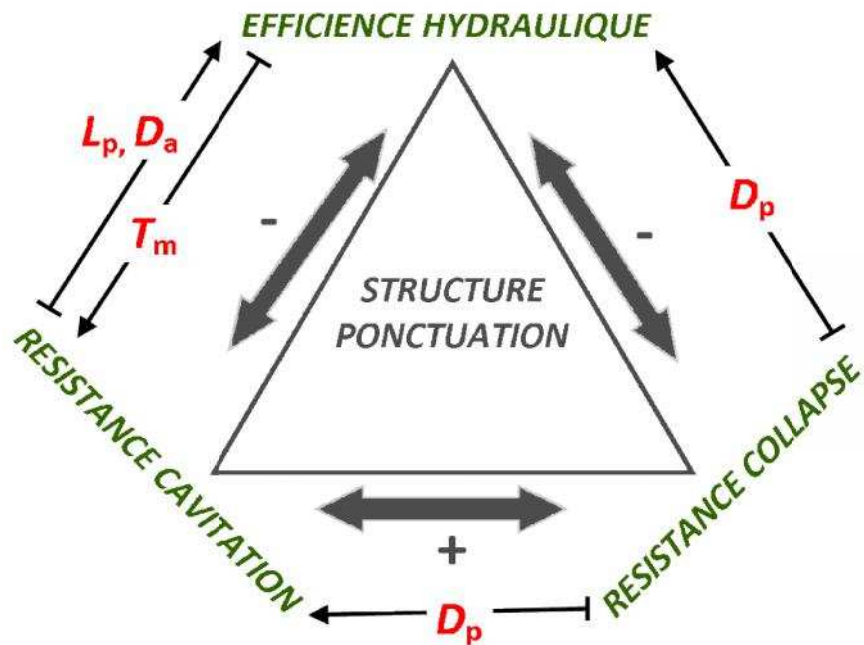


Figure 56 : Interactions entre les fonctions assurées par la ponctuation et l'influence de ses dimensions sur ces fonctions. Sa structure représente un compromis entre une efficacité de conduction, une résistance mécanique et à l'embolie. L'augmentation d'une dimension aura un effet positif (flèche pleine) sur une fonction et négatif (extrémité à bord plat) sur une autre. T_m : épaisseur de membrane, L_m : profondeur de la chambre de ponctuation, D_p : diamètre de la chambre de ponctuation, D_a : Diamètre de l'ouverture de la ponctuation.

avec la vulnérabilité à la cavitation des espèces pourraient être expliquées par le fait que ces paramètres soient moins contraints par d'autres fonctions des ponctuations que les diamètres de membranes et d'ouverture. La phylogénie des angiospermes tend d'ailleurs à montrer une diminution des dimensions des ponctuations ainsi que une augmentation de leur circularité au cours de l'évolution. Ainsi les ponctuations scalariformes (de grandes dimensions) sont considérées comme des structures primitives alors que les ponctuations circulaires seraient des structures plus récentes. Des variations de l'épaisseur de membrane et de la profondeur de chambre affecteraient typiquement moins la résistance au collapse du vaisseau que les diamètres de membrane et d'ouverture de la ponctuation. De plus, il est probable que l'augmentation de résistance au germe d'air se fasse au détriment de l'efficacité hydraulique (Figure 56). Un diamètre des ponctuations plus grand augmenterait la conductance et la résistance à la cavitation mais diminuerait la résistance mécanique des vaisseaux (Carlquist, 2001). Une augmentation de diamètre de l'ouverture de ponctuation augmenterait la conductance mais diminuerait la résistance à la cavitation (Ellmore et al., 2006; Schmitz et al., 2007). Une augmentation de l'épaisseur de la membrane augmenterait la résistance à la cavitation mais diminuerait l'efficacité de conduction (Sperry, 2003). Une diminution de profondeur de chambre augmenterait la résistance à la cavitation mais pourrait perturber les flux de sève à l'intérieur de la chambre. La modélisation de l'influence de la géométrie des ponctuations sur leur efficacité hydraulique permettrait d'aborder ces questions de compromis à l'échelle de la ponctuation.

3) *Perspectives*

Le modèle mécanique présente des limites à considérer. Ses principales limites sont qu'il ne prend pas en compte la circularité de la ponctuation et qu'il considère la membrane comme une plaque encastrée lorsqu'elle est aspirée contre les bordures. De plus, une limite de notre approche est que le modèle ne prend pas en compte les variations interspécifiques potentielles du module de Young des membranes. En considérant le module de Young de chaque espèce, les relations observées entre cavitation et comportement mécanique des ponctuations seraient probablement améliorées.

Le modèle considère des membranes circulaires et ne permet pas à ce jour d'analyser le comportement des ponctuations de formes non circulaires, ou encore l'effet de variations de circularité des ponctuations sur la vulnérabilité à la cavitation. Cette limite réside principalement dans la technique de microscopie utilisée. L'analyse de la structure des ponctuations nécessite des approches MET qui ne permettent pas de déterminer la circularité des ponctuations. Comme les dimensions d'une ponctuation sont probablement interdépendantes, il est important d'intégrer les dimensions à l'échelle d'une même ponctuation. Il n'est donc pas envisageable de mesurer la circularité sur d'autres ponctuations pour compléter notre étude. Les outils de nanotomographie

permettraient d'analyser la structure en 3D d'une ponctuation mais ne sont pas encore assez résolutive. Les ponctuations des angiospermes présentent une morphologie variable, de circulaire à allongée (Baas et al., 2004). Cette variabilité se retrouve entre espèce et au sein d'un même xylème. L'allongement d'une ponctuation semble augmenter son efficacité hydraulique et diminuer la résistance à l'implosion du vaisseau (Carlquist, 2001). Modéliser l'impact de l'allongement d'une ponctuation sur la résistance au germe d'air et à la résistance à la cavitation permettrait d'estimer leur résistance au germe d'air. La comparaison de la surface de ponctuation et de leurs ultrastructures entre espèces qui présentent différentes morphologies de ponctuations seraient complétées pour expliquer la variabilité de vulnérabilité à la cavitation (Schmitz et al., 2007).

Le modèle considère que la membrane se comporte comme une plaque encadrée, c'est-à-dire, fixée à sa périphérie. C'est fort probablement le cas au niveau de l'anneau, à l'intérieur de la chambre (Sperry and Hacke, 2004). Lorsque les membranes de ponctuations sont observées en MET, elles semblent systématiquement fixées au niveau de l'anneau, même après application d'une grande différence de pression. En revanche, le comportement de la membrane au niveau des bordures lorsqu'elle est aspirée par l'ouverture peut être différent. La membrane pourrait glisser sur les bordures ; toute la membrane subirait alors des déformations et non uniquement la portion non retenue par les bordures. Ensuite, les bordures sont considérées dans le modèle comme des structures fixes alors que leur résistance mécanique pourrait être éprouvée lorsqu'elles connectent un vaisseau sous tension à un vaisseau embolisé. Le germe d'air serait alors dépendant des propriétés de résistance de la membrane mais aussi de celle de la ponctuation, voire même du champ de ponctuations.

Le module d'Young est une composante intrinsèque de la membrane et est probablement fortement dépendant de la composition et de l'agencement des constituants de la membrane. A l'heure actuelle, le module d'Young des membranes de ponctuation peut être mesuré par microscopie à force atomique (AFM). Cette technique permet d'utiliser un cantilever microscopique doté d'une pointe pour appliquer une force à un matériau. Les données obtenues sont la déformation progressive du levier (cantilever) lors de l'indentation du matériau par la pointe. Les approches AFM sur ponctuations sont délicates pour plusieurs raisons. Tout d'abord les ponctuations représentent un matériau microscopique relativement rare dans une matrice de cellules du bois, et il est difficile d'aligner le cantilever avec une ponctuation. Ensuite, la nécessité de mesurer le module d'Young de la membrane dans un état natif hydraté ajoute des problèmes de dérives de l'échantillon. Il est difficile de fixer complètement et rapidement un échantillon hydraté sur le support et des dérives de quelques microns sont fréquentes et limitantes pour les mesures de module d'Young de membrane de ponctuations. Les expériences de micro-moulage peuvent représenter des modes de mesures alternatifs à l'AFM. Elles nous ont notamment permis d'estimer des déformations et bien

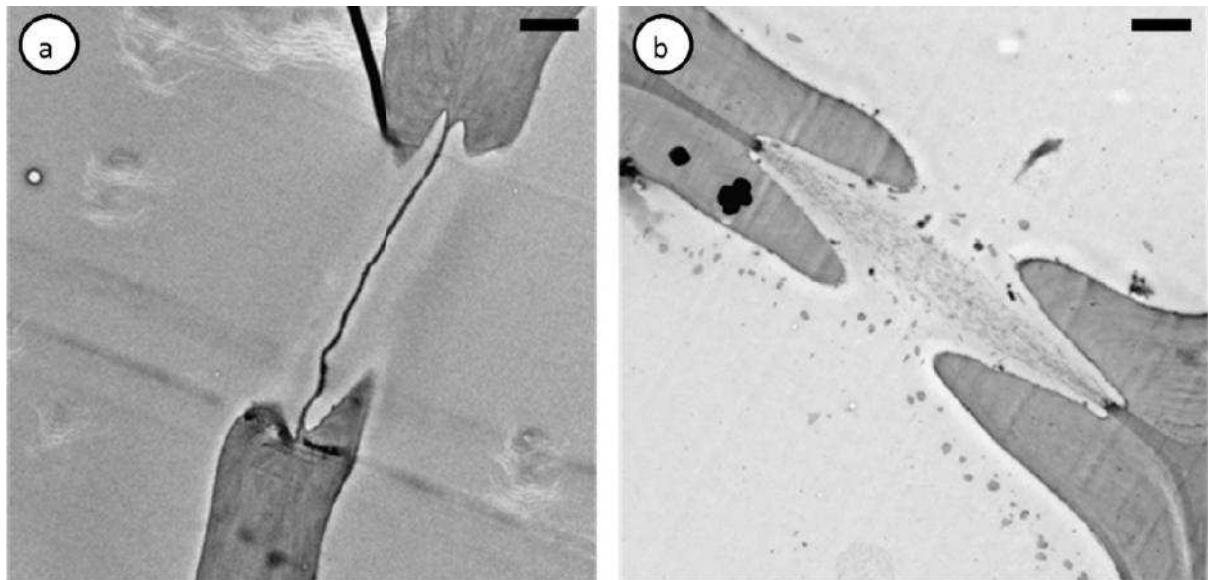


Figure 57 : Ponctuations de vaisseaux embolisés chez *Fagus sylvatica*. Des échantillons de tiges de *Fagus sylvatica* sont déshydratés totalement (a) et comparé à des échantillons témoins (b). L'épaisseur de la membrane de la ponctuation est diminuée dans les vaisseaux embolisés.

qu'elles soient approximatives, elles permettent d'analyser plus d'échantillons. Cette méthode pourrait être exploitée pour des études de variabilité intraspécifique et interspécifique.

II PROPRIETES INTRINSEQUES DE LA MEMBRANE

1) Propriétés physiques

Les propriétés intrinsèques de la membrane conditionneraient de différentes façon la vulnérabilité à la cavitation du xylème. La porosité, la surface de membrane, les déformations liées à une différence de pression semblent notamment être impliquées dans ce processus (Christman et al., 2009; Jansen et al., 2009; Lens et al., 2011). Les propriétés mécaniques telles que le module d'Young et le module de compressibilité de la membrane influeraient les déformations. Les propriétés de mouillabilité de la membrane conditionneraient l'interface du ménisque air/eau au niveau des pores de la membrane. Une membrane plus hydrophobe, présenterait un angle de contact (α) de l'interface membrane/air plus grand et diminuerait ainsi la pression de germe d'air, d'après l'équation :

$$P_e = -\frac{4\tau \cos(\alpha)}{D_p}$$

Pourtant, les propriétés de ce matériau sont largement méconnues. Le modèle considère que la ponctuation est un matériel homogène mais cela semble peu probable car les parois végétales ne sont pas des matériaux homogènes. Elles sont composées d'un réseau de microfibrilles de cellulose inclus dans une matrice de pectines et hémicellulose et/ou lignines. D'autre part, la membrane est constituée de trois couches avec une lamelle moyenne et deux parois primaires modifiées. Un aplatissement de la membrane dans les vaisseaux embolisés est observé (Figure 57). Sous contrainte, un matériau homogène présenterait des variations d'épaisseur plus faibles ou alors ces variations d'épaisseurs seraient associées à des variations de longueurs beaucoup plus importantes que celles que nous avons observées. L'aplatissement de la membrane dans les vaisseaux embolisés suggèrent un comportement mécanique de polymère poreux. Les micro fibrilles de cellulose sont classiquement observées sur une ponctuation et pourraient représenter un réseau enchevêtré avec des espaces dans lesquels la sève circulerait. Sous l'action d'une contrainte ou de la déshydratation, les microfibrilles seraient compactées les unes sur les autres. Il est envisageable que l'aplatissement de la membrane referme les espaces entre microfibrilles et diminue la porosité du matériau. A l'heure actuelle, il a été proposé que cette structure soit gélifiée par des pectines ou hémicellulose (Zwieniecki et al., 2001). Un comportement mécanique de type gel pourrait correspondre à ce phénomène d'aplatissement. Pourtant, les propriétés d'hydrogel de la membrane demeurent

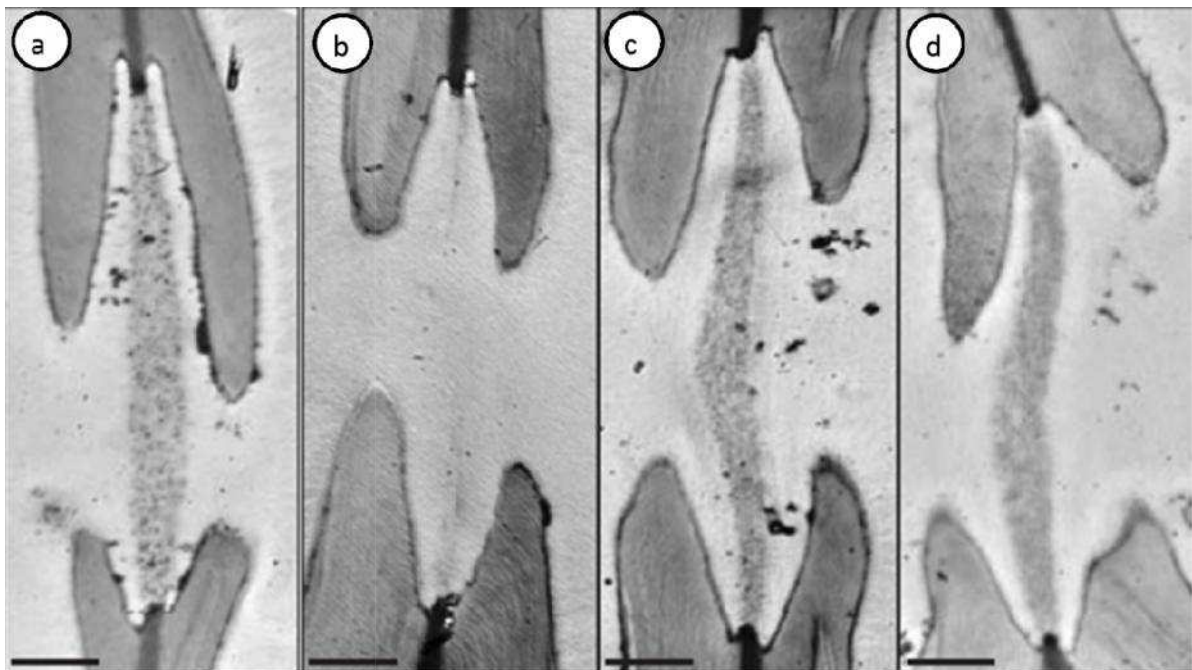


Figure 58 : Effets de traitements enzymatiques sur les punctuations de *Fagus sylvatica*. Des segments de tiges sont perfusés avec une solution témoin (a) ou avec une solution contenant une cellulase (b), une pecto-lyase (c) ou une hemicellulase (d) et incubés pendant 2 h à 37°C. Ensuite, des échantillons sont observés en MET. Les traitements de cellulases dégradent les membranes des punctuations alors qu'aucune différence n'est observée entre les échantillons témoins et les échantillons traités aux pecto-lyases et hémicellulases. Echelles : 1 μ m. (Dusotoit-Coucaud et al., 2013).

actuellement en débat en raison du peu de connaissance sur la composition de la membrane de ponctuation.

2) *Composition de la membrane*

La membrane de la ponctuation est constituée d'une lamelle moyenne entourée de deux parois primaires modifiées et pourrait contenir *a priori* de la cellulose, des hémicelluloses et des pectines, voire de lignines. Lors des étapes de mort programmée des cellules du xylème, les ponctuations subissent des processus d'hydrolyses. L'observation de micro-fibrilles de cellulose sur les ponctuations ainsi que des expériences de perfusion de cellulase chez *Populus tremula* et *Fagus sylvatica* attestent de la présence de cellulose dans la membrane (Figure 58, (Dusotoit-Coucaud et al., 2013). En effet, la perfusion de cellulase dans des rameaux induit la dégradation des membranes des ponctuations. En revanche, la présence de pectines et d'hémicellulose résiduelles sur la membrane après les étapes d'hydrolyses est discutée. Si des expériences de coloration spécifiques chez certaines espèces tendent à soutenir l'hypothèse de leur présence dans la membrane, d'autres expériences d'immunomarquages infirment cette hypothèse.

Des études basées sur des expériences de coloration au rouge ruthénium et à l'hydroxyl chloride amine ferrique, des colorants spécifiques des pectines acides et des pectines esterifiées respectivement, suggèrent une présence des pectines dans les membranes de quatre espèces de Lauraceae (Gortan et al., 2011; Nardini et al., 2011). La perfusion d'enzyme comme une polygalacturonase et une endo-1,4-b-glucanase dans un segment de tige induit une augmentation de la porosité des membranes des ponctuations chez *Vitis vinifera* (Pérez-Donoso et al., 2010). De plus, l'effet ionique sur la conductance est attribué aux propriétés d'hydrogel des pectines des ponctuations (Nardini et al., 2011). Les techniques de coloration présentent des inconvénients techniques car la résolution de la microscopie optique demeure insuffisante pour l'observation des membranes de ponctuations présentant une épaisseur inférieure au micron. De plus, les variations de densité aux électrons liées à présence d'un colorant lorsqu'elles sont observées en microscopie électronique sont à interpréter avec précaution, car elles peuvent être des artéfacts. Enfin, les colorations au rouge ruthénium qui sont classiquement utilisées pour marquer les pectines ne sont pas complètement spécifiques (Luft, 1971).

D'autres arguments sont en faveur d'une absence de pectines dans les membranes des ponctuations. Lors de la maturation d'une ponctuation, les processus de dégradation cibleraient les hémicellulose et les pectines. Des gènes codant pour des polygalacturonases présentent d'ailleurs une expression tardive dans la xylogénèse chez *Populus tremula x tremuloïdes* (Hertzberg et al., 2001). En effet, l'expression de ces gènes est augmentée lors dans les étapes tardives de la

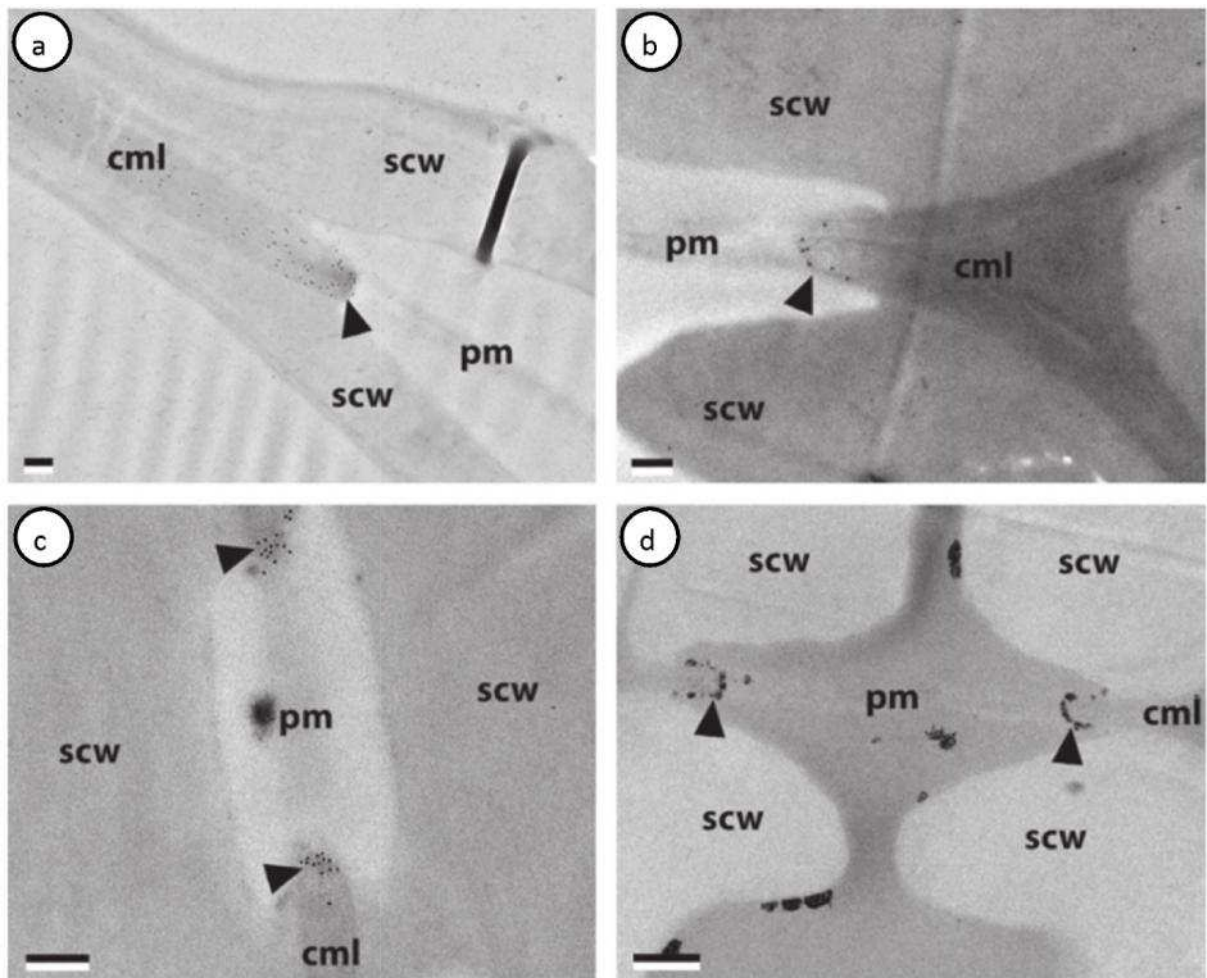


Figure 59 : Localisation des pectines et du calcium au niveau des ponctuations. Les ponctuations de *Populus balsamifera* (a), *Prunus virginiana* (b), *Betula papyrifera* (c) et *Amelanchier alnifolia* sont mises en présence des anticorps dirigés contre les homogalacturonanes faiblement methyl-esterifié (Anticorps JIM5, b-c) et fortement methyl-esterifié (Anticorps JIM7, a) ou en présence de l'antimonate qui précipite le calcium (d). Les différents marquages colocalisent avec l'anneau des membranes (flèche). scw : paroi secondaire, pm : membrane de ponctuation, cml : parois primaires et lamelle moyenne. Echelle : a-c : 0.2 μm , d : 0.5 μm . (Plavcová and Hacke, 2011)

xylogénèse et pourrait coïncider avec les processus de maturation de la ponctuation. Les résultats d'immunolocalisation sur ponctuations tendent à soutenir l'hypothèse d'absence de pectines dans les membranes de ponctuations matures. Les études d'immuno-marquage demeurent rares et sont réalisées sur un nombre restreint d'espèces. Or, la composition des membranes de ponctuations présente probablement une grande variabilité interspécifique. Des expériences d'immunomarquage avec les anticorps JIM5 et JIM70 montrent une absence d'homogalacturonane sur la membrane chez *Populus trichocarpa x deltoïdes* (Plavcová et al., 2011). Les mêmes auteurs montrent une distribution hétérogène des HG sur la membrane de ponctuation avec les mêmes anticorps chez *Populus balsamifera*, *Prunus virginiana*, *Betula papyrifera* et *Amelanchier alnifolia* (Plavcová and Hacke, 2011). Les HG sont localisés au niveau de l'anneau (Figure 59). De plus, aucune hémicellulose n'a été détectée chez *Citrus sinensis* (Alves et al., 2009). Des xylanes et des galactoglucomannanes sont détectés sur des membranes de ponctuation chez *Cryptomeria japonica* mais seulement dans les phases précoces de formation (Kim et al., 2010; Kim et al., 2011). Les ponctuations matures n'en présentent plus. Dans le cadre du projet ANR pitbulles, des immunomarquages mettent en évidence la présence de cellulose et de lignine dans la membrane de la ponctuation mature de peuplier, une présence très localisée de pectines au niveau de l'anneau de la membrane et l'absence d'hémicellulose. Les membranes de ponctuations non matures présentent en revanche une composition classique de paroi primaire avec détection de cellulose, et pectines. Les études en immuno-marquages peuvent présenter des limites lorsqu'une molécule d'une matrice n'est pas détectée. En effet, il est possible que les sites antigéniques soient masqués. C'est pourquoi cette dernière étude sur peuplier a été réalisée avec une large gamme d'anticorps et des traitements permettant de libérer des sites antigéniques. Si une variabilité interspécifique de composition de membrane peut être attendue, il semble que les membranes de ponctuation de peuplier ne présentent pas de pectines en dehors de l'anneau. La perfusion de pecto-lyase, dans des rameaux ne semble pas altérer visiblement la structure des ponctuations mais induit une augmentation de la vulnérabilité à la cavitation chez *Populus tremula* et *Fagus sylvatica* (Figure 59) (Dusotoit-Coucaud et al., 2013). Les propriétés de l'anneau des ponctuations pourraient être modifiées.

Au-delà du débat sur la présence de pectines dans les ponctuations, ces composants demeurent potentiellement intéressants car ils conditionnent aussi les propriétés de la paroi primaire au moment de l'expansion et ils peuvent ainsi avoir des effets sur les dimensions des vaisseaux, la densité et la taille des ponctuations. Les résultats de cette thèse, ainsi que ceux de perfusion de pecto-lyase, soutiennent l'hypothèse de l'implication des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation.

L'absence de molécules hydrophiles dans une grande partie des membranes de ponctuation, telles que des pectines et des hémicelluloses, est à l'encontre d'éventuelles propriétés d'hydrogel de

ces membranes chez le peuplier. Les membranes de peuplier ne seraient alors qu'une structure poreuse de polymères amorphes. Si l'on considère une structure poreuse le repliement de cette structure dans les vaisseaux embolisés qui est présenté en figure 54 pourrait diminuer sa porosité et limiter la propagation de l'air à travers la membrane.

III BASES GENETIQUE DE LA VULNERABILITE A LA CAVITATION

Afin de prospecter les bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation nous avons opté pour une approche gène candidat qui consiste en la génération de peupliers transgéniques et le criblage de mutants chez *Arabidopsis thaliana*. Les gènes candidats ciblés étaient des gènes impliqués dans les liaisons des pectines par le calcium ou le borate. Les approches de transcriptomiques, classiquement utilisés pour appréhender le rôle des gènes, présentent des limites. En effet les variations d'expression géniques observées sont souvent inhérentes aux cellules du parenchyme et masquent probablement les expressions liées aux ponctuations (Awad, 2011). De plus, des études menées sur des populations provenant de conditions climatiques différentes de *Pinus pinaster* et *Fagus sylvatica* montrent une grande plasticité phénotypique et une faible différenciation génétique entre populations pour la vulnérabilité à la cavitation (Lamy et al., 2011; Wortemann et al., 2011). La faible différenciation génétique entre populations, et les fortes variabilités intra population de ce caractère limitent des approches de recherche de *SNP* (Single Nucleotide Polymorphism) ou de zones du génome liées à une sélection de la résistance à la cavitation. Une approche gène candidat nous semblait plus appropriée. Cette approche nous a permis d'identifier des gènes impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation. En revanche, les différences phénotypiques observées étaient faibles. La pertinence de l'approche gène candidat nécessite donc d'être discutée.

1) Pertinence de l'approche gène candidat

Les peupliers transgéniques permettent de mettre en évidence le rôle de certains gènes dans la vulnérabilité à la cavitation (Voelker et al., 2011; Awad et al., 2012). Des gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines ont ainsi été montrés comme impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation.

Toutefois, les différences de vulnérabilité à la cavitation chez ces lignées demeurent faibles. Il est donc difficile de déceler les différences structurales à l'origine de ces faibles différences phénotypiques et les variations de vulnérabilité à la cavitation peuvent être associées à d'autres paramètres structuraux du bois. Ces faibles effets physiologiques sont probablement inhérents au rôle essentiel de la paroi des végétaux, car il s'avère délicat de modifier la structure de la paroi sans affecter la survie cellulaire. Les lignées régénérées seraient celles présentant les plus faibles effets.

Nous avons opté pour une surexpression spécifique au xylème afin de limiter les effets létaux mais les variations physiologiques sont demeurées relativement faibles (0.27 MPa). De plus, le peuplier est une espèce relativement vulnérable à la cavitation. La vulnérabilité à la cavitation de cette espèce ne pourrait donc être que peu augmentée. D'ailleurs, les peupliers ont été cultivés sous un régime hydrique favorable, une condition qui accroît d'autant plus cette vulnérabilité. Une autre raison de ces faibles effets est que ce caractère important peut aussi être régulé par des ajustements structuraux compensant les effets sur les ponctuations. Par exemple, des effets sur l'ultrastructure des ponctuations pourraient être compensés par des variations de l'aire des ponctuations. L'aire des ponctuations serait modulée par les dimensions des vaisseaux, et leur organisation avec notamment des variations de groupement de vaisseaux.

Les analyses des fonctions hydrauliques en lien avec la structure du bois ont été surtout réalisées à l'échelle interspécifique. Les techniques de phénotypage sont donc adaptées à des grandes variations du caractère de vulnérabilité à la cavitation. Il est possible que ces techniques présentent des limites de résolution pour l'analyse des faibles variations intraspécifiques présentes dans les lignées transformées

La comparaison des propriétés hydrauliques des lignées transformées sous un régime hydrique contraignant peut permettre de contraster la variabilité de ces propriétés, notamment d'accentuer les différences de vulnérabilité à la cavitation des génotypes. De telles conditions ont permis d'accentuer des différences de vulnérabilité à la cavitation chez des lignées de peuplier transformées pour le métabolisme des lignines (Awad, 2011). Ensuite, le modèle mécanique pourrait être utilisé pour analyser la structure des ponctuations. Il permettrait de faire un phénotypage fin et de quantifier les conséquences d'une faible variation structurale à l'échelle de la ponctuation mais aussi des possibles compensations structurales qu'elle peut expérimenter. Il est envisageable que les différentes dimensions d'une ponctuation varient conjointement.

Le criblage de mutants chez *Arabidopsis thaliana* présente les mêmes limites que l'approche de transgénèse par surexpression, avec de faibles effets sur le phénotype probablement inhérents au rôle constitutif de la paroi. L'avantage de cette approche réside dans la large disponibilité des mutants sur les banques de graines et dans la rapidité de phénotypage. La production de peupliers transgéniques est un processus long et l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* permet de tester plus rapidement le rôle de nombreux gènes. En revanche, s'il y a une grande similarité des structures et des fonctions hydrauliques du xylème, cette plante herbacée ne présente pas un mode de vie pérenne et une organisation différente du xylème. Ce modèle ne peut être assimilé à un modèle d'arbre. Le double mutant ligneux *sox1* présente l'avantage d'avoir un bois très développé et comparable à celui des arbres (Melzer et al., 2008). La différence de P_{50} avec les plantes non transformées est de 1 MPa, ce qui représente une forte variation intraspécifique. Ces gènes sont

impliqués dans la régulation de la date de floraison en réponse à la photopériode. Des approches de transcriptomiques sur ce mutant pourraient permettre de détecter des gènes de régulations de la xylogénèse qui seraient potentiellement impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation. Il semble que le xylème secondaire soit plus résistant à l'embolie. La cause de cette plus forte résistance pourrait être liée à la structure du xylème, notamment par les dimensions des vaisseaux ou leur connectivité qui influeraient l'aire de ponctuation. Elle pourrait être liée à des variations de structure des ponctuations et notamment de leur morphologie (Oda and Fukuda, 2012). Les conséquences de ces mutations sur la structure du xylème restent à étudier plus finement.

L'approche gène candidat permet de détecter des gènes impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation et peut donc être considérée comme pertinente pour prospector les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Les faibles différences phénotypiques observées représentent des limites de cette approche. Le phénotypage pourrait être donc adapté à ces faibles différences. Nos résultats sur le mutant *soxful* chez *Arabidopsis thaliana* suggèrent que des gènes de régulation de la xylogénèse pourraient être testés.

2) Rôle des pectines et des polygalacturonases dans la vulnérabilité à la cavitation

La réussite de l'approche gène candidat repose essentiellement sur le choix des gènes candidats. Lors de ce choix, il y avait de fortes présomptions de présences de pectines dans les membranes des ponctuations. Les récentes études d'immunomarquages tendent à montrer que les pectines ne sont pas présentes dans toute la membrane mais qu'elles seraient concentrées dans l'anneau de la membrane (Plavcová et al., 2011; Plavcová and Hacke, 2011). L'anneau présente une densité aux électrons différente de la paroi primaire et de la membrane de ponctuation (Schmid, 1965; Schmid and Machado, 1968). Les immunomarquages montrent aussi une composition différente. Si les phénomènes d'hydrolyses sont régulés spatialement au niveau des parois des vaisseaux, elles semblent aussi régulées au niveau de la membrane de la ponctuation. L'anneau pourrait ainsi avoir des propriétés physiques différentes et une fonction spécifique. Plavcová et Hacke (2011) proposent que l'effet du calcium sur la vulnérabilité à la cavitation soit lié à l'anneau. Ils corrélerent l'intensité de l'effet du calcium sur le P_{50} avec la longueur de l'anneau sur 4 espèces. Ils reportent que les microfibrilles de cellulose sont alignées de manière circulaire au niveau de l'anneau et que cette zone serait donc plus sollicitée mécaniquement que le reste de la membrane. Ils proposent alors deux hypothèses sur l'effet du calcium sur la vulnérabilité à la cavitation : i) la précipitation du calcium générerait des pores ou micro-fractures à l'origine d'un germe d'air au niveau de l'anneau, ou ii) détendrait l'anneau, ce qui conduirait à une déflexion plus grande de la membrane et ainsi augmenterait les déformations subies par la membrane. Notre travail sur le comportement mécanique de la membrane soutient l'hypothèse d'un rôle mécanique de l'anneau

dans la vulnérabilité à la cavitation. Les contraintes d'une plaque fine encastrée sont théoriquement maximales à la périphérie. Si la membrane n'était pas encastrée ou faiblement fixée au niveau de l'anneau, elle pourrait se rompre à la périphérie sous l'action de la pression, facilitant la propagation de l'air dans le xylème. En revanche, la déformation serait maximale au centre et minimale à la périphérie. Les *HG* pourraient alors avoir un rôle rigidifiant au niveau de l'anneau. La membrane des ponctuations est classiquement considérée

comme homogène par opposition aux membranes hétérogènes des gymnospermes, mais il est possible que la structure de la membrane soit un caractère homoplasique et que l'anneau et la membrane de la ponctuation soient deux parties de la membrane aux fonctions différentes.

Les approches de transgénèse du peuplier et de criblage de mutants d'*Arabidopsis thaliana* montrent une implication des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation. En effet, la surexpression d'une *PG* chez des peupliers transgéniques et une mutation d'une *PG* chez *Arabidopsis thaliana* augmentent la vulnérabilité à la cavitation. Les pectines ne seraient pas impliquées dans la porosité et l'élasticité de la membrane mais pourraient avoir un rôle dans l'élasticité de l'anneau ou sa résistance mécanique. La perfusion de pectolyase exogène présente un effet plus fort sur la vulnérabilité à la cavitation (Dusotoit-Coucaud et al., 2013) que la surexpression d'une *PG* chez les plantes transformées, probablement parce que la digestion enzymatique par perfusion est beaucoup plus efficace. La surexpression d'un gène de dégradation des pectines localisée dans le bois présente un effet similaire d'augmentation de la vulnérabilité à la cavitation que la mutation de l'endogène chez *Arabidopsis thaliana*.

Il est possible que les effets observés chez les peupliers transgéniques et les mutants d'*Arabidopsis* aient pour origines des modifications structurales différentes. Une altération de la paroi primaire chez *Arabidopsis thaliana* pourrait typiquement avoir des effets sur les dimensions des vaisseaux, et ainsi affecter l'aire de ponctuation. Une augmentation du diamètre des vaisseaux pourrait aussi générer un xylème moins redondant et donc plus vulnérable à l'embolie (Carlquist, 1984). Un xylème avec des plus petits vaisseaux pour une même surface de bois serait plus redondant. Toutefois, la notion de redondance du xylème développée par Carlquist (1984) s'appuie aussi sur la connectivité des vaisseaux. Il propose qu'un xylème avec des vaisseaux plus solitaires, serait plus résistant à l'embolie car la propagation de l'air serait limitée. Cette tendance est observée dans le genre *Acer* avec les espèces les plus résistantes à l'embolie présentant une connectivité de vaisseaux plus faible (Lens et al., 2011). Toutefois, une étude similaire menée sur le genre *Prunus* montre une tendance inverse (Scholz et al., 2013). Il est probable que les adaptations du xylème à l'embolie de ces deux genres ne présentent pas les mêmes stratégies.

Une analyse de la conductivité de mutant *Arabidopsis thaliana pg* à été réalisée dans des conditions similaires à celles explicitées dans le chapitre II de la partie résultats concernant la

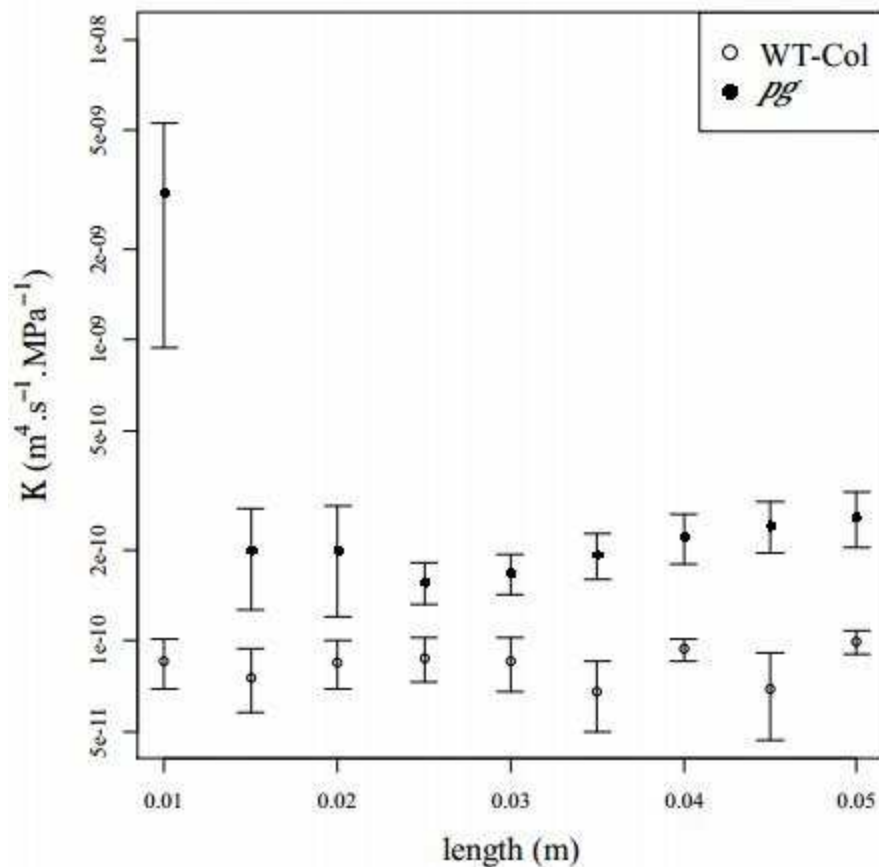


Figure 60 : Conductivité du mutant *pg* d'*Arabidopsis thaliana*. La conductivité est mesurée sur des segments de tiges de 5 cm puis sur des segments de ces mêmes tiges successivement raccourcis jusqu'à une taille minimale de 1cm. Les données représentées sont les moyennes de 5 plantes témoins et 6 mutants *pg* et les barres représentent l'erreur standard. Les 2 génotypes présentent des conductivités significativement différentes (ANOVA, $P < 0.05$)

génération et caractérisation de peuplier transgéniques. L'analyse montre que le mutant *pg* a une conductivité significativement supérieure au génotype sauvage. Cette conductivité plus élevée pourrait être due à des vaisseaux plus longs et/ou de plus grands diamètres (Figure 60). Pour une longueur de 1 cm, la conductivité des mutant *pg* augmente brusquement, ce qui suggère que la résistance associée aux terminaisons de vaisseaux ponctuations serait supprimée. Ces résultats préliminaires suggèrent que les mutants auraient des vaisseaux plus longs que les plantes non transformées. Le fait que la mutation du gène endogène *PG* induise des variations de conductivité chez *Arabidopsis thaliana* qui ne sont pas présentes dans les lignées transgéniques de peuplier supporte l'hypothèse que les variations de P_{50} chez ces plantes transformées soient causées par d'autres modifications structurales. Cette augmentation du diamètre des vaisseaux peut aussi expliquer une augmentation de la vulnérabilité à la cavitation (diminution de redondance du xylème ou augmentation de l'aire de ponctuations).

Si l'effet des pectines sur les propriétés des ponctuations est lié à l'anneau, il sera difficile d'analyser les changements structuraux chez les peupliers transgéniques ou les mutants d'*Arabidopsis thaliana*. Par contre, l'observation des déformations avec injection de silicone permettrait de tester l'hypothèse du rôle des pectines dans des propriétés mécaniques de l'anneau. L'effet sur le P_{50} des perfusions enzymatiques étant plus grand, il serait intéressant de réaliser ses expériences sur ce type d'échantillons. On peut alors s'attendre à des déformations plus grandes pour les ponctuations aux pectines dégradées.

3) Perspectives

Les objectifs à court terme de ce travail sont la poursuite du phénotypage des lignées transformées. Le phénotypage des lignées *AnPG* et du mutant *PG* nécessite d'être poursuivi et les autres lignées régénérées doivent être phénotypées pour leur vulnérabilité à la cavitation. Ensuite, d'autres gènes pourraient être testés.

Afin de comprendre l'implication des polygalacturonases dans la vulnérabilité à la cavitation, il est nécessaire d'analyser la structure du xylème des lignées transgéniques *AnPG* et du mutant *pg*. Les dimensions de vaisseaux, leur connectivité, l'aire de ponctuation ainsi que la structure des ponctuations pourrait être analysée. Le modèle mécanique permettrait d'analyser finement la structure des ponctuations. Ensuite, le potentiel de déformation des membranes de ponctuation pourrait être évalué par des expériences de micromoulages de ponctuations.

Les lignées transgéniques de peupliers pour les gènes impliqués dans le métabolisme des hémicelluloses doivent aussi être phénotypées pour leur vulnérabilité à la cavitation.

Le double mutant *socful* présente des différences de vulnérabilité à la cavitation avec les plantes non transformées. Toutefois, les modifications structurales du xylème qui sont à l'origine d'une résistance à la cavitation plus grande ne sont pas encore élucidées. Une analyse de l'anatomie du xylème permettrait de tester si ce sont des changements dans les dimensions de vaisseaux, leur connectivité qui influeraient l'aire de ponctuation ou encore la structure des ponctuations. Ce double mutant représente un outil intéressant pour identifier des gènes candidats de la vulnérabilité à la cavitation. Des approches transcriptomiques de type bio-puces permettraient de déterminer comment des gènes de régulation de la xylogénèse, de régulation de disposition des ponctuations ou encore de biosynthèse et de modification des constituants de la paroi sont affectés. Des gènes impliqués dans la régulation du développement du xylème sont identifiés et pourraient être testés (Oda and Fukuda, 2012; Schuetz et al., 2012b; Miyashima et al., 2013). Ils affecteraient l'aire de ponctuation et leur géométrie.

Avec les données récentes de la littérature, il y a désormais d'autres gènes candidats pour les bases moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation. La présence des lignines dans les ponctuations suggèrent qu'elles soient impliquées dans les propriétés des ponctuations. Une analyse de l'ultra structure et de la composition des ponctuations de lignées de peuplier modifiées pour le métabolisme des lignines (Awad et al., 2012) reste à faire pour expliquer leur vulnérabilité. Les gènes conditionnant la morphologie et la disposition des ponctuations sont de nouvelles pistes (Oda and Fukuda, 2012). Les protéines MAP70 affecteraient la circularité des ponctuations et contrôlèrent ainsi leur résistance à la cavitation. Les protéines MIDD1 et RIP3 affecteraient la densité de ponctuations sur les parois, donc l'aire de ponctuation qui conditionne la vulnérabilité à la cavitation. Des mutants d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* pour ces gènes pourraient être criblés pour leur vulnérabilité à la cavitation dans un premier temps. De plus, les modèles de xylogénèse et d'apposition de la paroi secondaire dans les cellules conductrices renseignent sur les gènes à l'origine de la régulation de la xylogénèse et des ponctuations. Ces modèles faciliteraient l'identification des gènes spécifiques des vaisseaux au sein du xylème. L'étude des gènes régulés par les facteurs de transcription VND6 et 7 qui sont spécifiques de la genèse des vaisseaux, fournira de nouveaux gènes candidats. Les MAP régulées par VND6 et 7 sont des gènes potentiellement importants pour la vulnérabilité à la cavitation. De plus, la composition de paroi d'un type cellulaire spécifique a été altérée chez des transformants d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant le promoteur du gène VND6 (Yang et al., 2013). Après avoir diminué la teneur en lignines des fibres, un gène contrôlant la synthèse des lignines a été exprimé spécifiquement dans les vaisseaux grâce au promoteur VND6. Les parois des fibres ont été enrichies en cellulose et hémicellulose. Une modification spécifique des parois des vaisseaux avec le promoteur VND6 pourrait être envisagée par la génération de plantes

transgéniques. De telles expériences de transgénése offrent aussi la possibilité d'étudier les relations de compromis entre vulnérabilité à la cavitation et résistance mécanique à l'échelle du tissu.

L'étude de la variabilité intraspécifique de la vulnérabilité à la cavitation permettrait de comprendre les bases génétiques de ce caractère hautement adaptatif (Stiller and Sperry, 2002; Herbette et al., 2010; Lamy et al., 2011; Wortemann et al., 2011; Plavcová and Hacke, 2012). L'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation semble être réalisée par un ensemble d'adaptations anatomiques incluant la modification des dimensions des vaisseaux, la variation de l'aire de ponctuation, la morphologie des ponctuations et potentiellement la connectivité des vaisseaux. Une meilleure compréhension de l'influence de ces paramètres structuraux du xylème sur sa vulnérabilité à la cavitation aiderait au choix de gènes candidats. D'autre part, l'étude de la réponse de ce caractère aux conditions de l'environnement permettrait d'identifier les facteurs de régulations génétiques à l'origine de ses variations.

IV CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail de thèse, nous proposons un modèle mécanique de déformation des membranes des ponctuations qui permet d'expliquer la variabilité interspécifique de la vulnérabilité à la cavitation. Il renseigne montre que le phénomène de cavitation surviendrait au niveau de la membrane après aspiration contre les bordures. D'autre part, nous avons construit des lignées transgéniques modifiées pour l'expression d'un gène du métabolisme des pectines. Nous avons aussi montré que *Arabidopsis thaliana* était une plante modèle pour l'étude des fonctions hydrauliques du xylème. Ce modèle permet de prospecter les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. L'étude des lignées transgéniques de peuplier et d'un mutant *Arabidopsis thaliana* modifiés pour l'expression de polygalacturonases met en évidence l'implication de ces enzymes et plus généralement des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation. L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer un rôle des pectines au niveau de l'anneau de la membrane. Ainsi les pectines rigidifient l'anneau pour résister aux contraintes lorsque la membrane est soumise à une différence de pression. Nous proposons de tester cette hypothèse par des expériences de micromoulages au silicone.

Le travail de thèse s'est focalisé sur le rôle des ponctuations entre vaisseaux dans la vulnérabilité à la cavitation. Si les ponctuations entre vaisseaux semblent être importantes, la vulnérabilité à la cavitation peut aussi dépendre d'autres structures. En effet, la propagation de l'embolie semble être associée aux ponctuations entre cellules conductrices, mais il est propable qu'il y ait d'autres sites de cavitation dans le xylème. Les fibres sont des cellules remplies d'air, la cavitation pourrait donc se produire par aspiration de l'air des fibres dans le réseau hydraulique. L'implication de la structure des ponctuations connectant les vaisseaux aux fibres pourrait être

prospectée. La surface des parois serait aussi d'importance pour la vulnérabilité à la cavitation, car les nucléations pourraient avoir lieu au niveau de petites bulles accolées aux parois des vaisseaux (Kohonen and Helland, 2009). Les propriétés de mouillabilité des parois conditionneraient alors l'interaction air/eau de ces bulles.

BIBLIOGRAPHIE

ACS (2013) Transport of Water and solutes in plants. Accessed online 22/10/2013

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect19.htm>

Ahn J-W, Verma R, Kim M, Lee J-Y, Kim Y-K, Bang J-W, Reiter W-D, Pai H-S (2006) Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *The Journal of biological chemistry* **281**: 13708–13716

Alder NN, Sperry JS, Pockman WT (1997) Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* **105**: 293–301

Allen CD (2009) Climate-induced forest dieback: an escalating global phenomenon? *Unasylva* **60**: 43–49

Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, et al (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660–684

Alves E, Leite B, Pascholati SF, Ishida ML, Andersen C (2009) *Citrus sinensis* leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. *Scientia Agricola* **66**: 218–224

Améglio T, Bodet C, Lacoïnte A, Cochard H (2002) Winter embolism , mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. 1211–1220

Amigues JP, Debaeke P, Itier B, Lemaire G, Seguin B, Tardieu F, Thomas A (2006) Sécheresse et agriculture. Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau . Synthèse du rapport d'expertise réalisé par l'INRA. 1–72

Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of experimental botany* **63**: 43–57

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

Awad H (2011) Etude des déterminants de la vulnérabilité à la cavitation du xylème chez le peuplier. 1–145

- Awad H, Herbette S, Brunel N, Tixier A, Pilate G, Cochard H, Badel E** (2012) No trade-off between hydraulic and mechanical properties in several transgenic poplars modified for lignins metabolism. *Environmental and Experimental Botany* **77**: 185–195
- Baas P, Schweingruber FH** (1987) Ecological trends in the wood anatomy of trees, shrubs and climbers from Europe. *IAWA bulletin* **8**: 245–274
- Baas P, Ewers FW, Davis SD, Wheeler E** (2004) Evolution of xylem physiology. *The evolution of plant physiology*. Press, Elsevier Academic, London, pp 273–295
- Barigah TS, Ibrahim T, Bogard A, Faivre-Vuillin B, Lagneau LA, Montpied P, Dreyer E** (2006) Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree physiology* **26**: 1505–16
- Barigah TS, Charrier O, Douris M, Bonhomme M, Herbette S, Améglio T, Fichot R, Brignolas F, Cochard H** (2013) Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of botany*. doi: 10.1093/aob/mct204
- Barnett JR** (1982) Plasmodesmata and pit development in secondary xylem elements. *Planta* **155**: 251–260
- Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M** (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* **175**: 389–395
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23–58
- Bauch J, Schultze R, Liese W** (1972) Morphological variability of bordered pit membranes in gymnosperms. *Wood Science and Technology* **6**: 165–184
- Beguerisse-Diaz M, Hernández-Gómez MC, Lizzul AM, Barahona M, Desikan R** (2012) Compound stress response in stomatal closure: a mathematical model of ABA and ethylene interaction in guard cells. *BMC systems biology* **6**: 146
- Bettiati D, Petit G, Anfodillo T** (2012) Testing the equi-resistance principle of the xylem transport system in a small ash tree: empirical support from anatomical analyses. *Tree physiology* **32**: 171–177
- Bigler C, Gavin DG, Gunning C, Veblen TT** (2007) Drought induces lagged tree mortality in a subalpine forest in the Rocky Mountains. *Oikos* **116**: 1983–1994

- Blevins DG, Lukaszewski KM** (1998) Boron in Plant Structure and Function. Annual review of plant physiology and plant molecular biology **49**: 481–500
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. Annual review of plant biology **54**: 519–46
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E** (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses , adaptation processes and long-term consequences. Annals of forest sciences **63**: 625–644
- Brendel O, Cochard H** (2011) Comment les espèces végétales s’adaptent au stress hydrique. L’eau pour les Forêts et les hommes en région méditerranéenne. pp 84–89
- Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews M a, Shackel K a** (2010) The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography. Plant physiology **154**: 1088–1095
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Gutiérrez M V** (2002) Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. Plant, Cell and Environment **25**: 1435–1444
- Brodribb TJ, Holbrook NM** (2003) Stomatal Closure during Leaf Dehydration , Correlation with Other Leaf Physiological Traits. Plant physiology **132**: 2166–2173
- Brodribb TJ, Cochard H** (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. Plant physiology **149**: 575–584
- Brodribb TJ, McAdam S a M** (2011) Passive origins of stomatal control in vascular plants. Science (New York, NY) **331**: 582–5
- Caffall KH, Mohnen D** (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydrate research **344**: 1879–900
- Capodicasa C, Vairo D, Zabolina O, McCartney L, Caprari C, Mattei B, Manfredini C, Aracri B, Benen J, Knox JP, et al** (2004) Targeted Modification of Homogalacturonan by Transgenic Expression of a Fungal Polygalacturonase Alters Plant Growth. Plant physiology **135**: 1–11
- Carlquist S** (1966) Wood anatomy of compositae: a summary, with comments on factors controlling wood evolution. Aliso **6**: 25-44
- Carlquist S** (1984) Vessel grouping in dicotyledon wood: significance and relationship to imperforate tracheary elements. Aliso **10**: 505–525

- Carlquist S** (2001) Comparative wood anatomy. Systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood, 2nd ed. Berlin
- Carlquist S** (2007a) Bordered pits in ray cells and axial parenchyma : the histology of conduction , storage, and strength in living wood cells. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 157–168
- Carlquist S** (2007b) Wood Anatomy of Crossosomatales: Patterns of Wood Evolution with Relation to Phylogeny and Ecology. *Aliso* **24**: 1–18
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **3**: 1–30
- Chaffey N, Cholewa E, Regan S, Sundberg B** (2002) Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia plantarum* **114**: 594–600
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J** (2003) Pit Membrane Porosity and Water Stress-Induced Cavitation in Four Co-Existing Dry Rainforest Tree Species. *Plant physiology* **131**: 41–48
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki M a, Smets E, Holbrook NM** (2004) Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *Journal of experimental botany* **55**: 1569–1575
- Choat B, Brodie TWB, Cobb ARC, Zwieniecki MAZ, Holbrook NM** (2006) Direct measurements of intervessel pit membrane hydraulic resistance in two angiosperm tree species. *American journal of botany* **93**: 993–1000
- Choat B, Cobb AR, Jansen S** (2008) Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New phytologist* **177**: 608–625
- Choat B, Pittermann J** (2009) New insights into bordered pit structure and cavitation resistance in angiosperms and conifers. *New Phytologist* **182**: 557–560
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, et al** (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752–755
- Christman M a, Sperry JS, Adler FR** (2009) Testing the “rare pit” hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New phytologist* **182**: 664–674

- Christman M a, Sperry JS, Smith DD** (2012) Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species. *New phytologist* **193**: 713–720
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier a, Ogée J, Allard V, Aubinet M, Buchmann N, Bernhofer C, Carrara a, et al** (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**: 529–533
- Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT** (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves. *Plant physiology* **100**: 2005–209
- Cochard H** (1992) Vulnerability of several conifers to air embolism. *Tree physiology* **11**: 73–83
- Cochard H, Bréda N, Granier A** (1996) Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: evidence for stomatal control of embolism ? *Annals of forest sciences* **53**: 197–206
- Cochard H, Peiffer M, Le Gall K, Granier A** (1997) Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L.: impact on water relations. *Journal of experimental botany* **48**: 655–663
- Cochard H, Lemoine D, Dreyer E** (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, Cruiziat P** (2001) The cohesion theory debate continues The cohesion theory debate continues: the pitfalls of cryobiology. *Trends in plant Science* **6**: 456–457
- Cochard H** (2002a) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, cell and environment* **25**: 815–819
- Cochard H** (2002b) Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. *Planta* **215**: 466–71
- Cochard H, Froux F, Mayr S, Coutand C** (2004) Xylem Wall Collapse in Water-Stressed Pine Needles. *Plant physiology* **134**: 401–408
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T** (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**: 410–418
- Cochard H** (2006) Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique* **7**: 1018–1026

- Cochard H, Hölltä 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
- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel E, Ennajeh M, Vilagrosa A** (2010a) Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant, cell et environment* **33**: 1543–1552
- Cochard H, Herbette S, Hernández E, Hölltä T, Mencuccini M** (2010b) The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *Journal of experimental botany* **61**: 275–85
- Cochard H, Badel E, Herbette S, Delzon S, Choat B, Jansen S** (2013) Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review. doi: 10.1093/jxb/ert193
- Coleman HD, Samuels a L, Guy RD, Mansfield SD** (2008) Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar--a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation. *Plant physiology* **148**: 1229–1237
- Cruiziat P, Améglio T, Cochard H** (2001) La cavitation: un mécanisme perturbant la circulation de l' eau chez les végétaux. *Medical industries* **2**: 289–298
- David TS, Henriques MO, Kurz-Besson C, Nunes J, Valente F, Vaz M, Pereira JS, Siegwolf R, Chaves MM, Gazarini LC, et al** (2007) Water-use strategies in two co-occurring Mediterranean evergreen oaks: surviving the summer drought. *Tree physiology* **27**: 793–803
- Davis SD, Sperry JS, Hacke UG** (1999) The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American journal of botany* **86**: 1367–1372
- Delzon S, Douthe C, Sala A, Cochard H** (2010) Mechanism of water-stress induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal capillary-seeding. *Plant, cell et environment* **33**: 2101–2111
- Dirmeyer P a., Gao X, Zhao M, Guo Z, Oki T, Hanasaki N** (2006) GSWP-2: Multimodel Analysis and Implications for Our Perception of the Land Surface. *Bulletin of the American Meteorological Society* **87**: 1381–1397
- Dixon H** (1914) Transpiration and the ascent of sap in plants. 217
- Domec J-C, Lachenbruch B, Meinzer F** (2006) Bordered pit structure and function determine spatial patterns of air-seeding threshold in xylem of Douglas-fir (*Pseudotsuga mensiesii*; Pinacear) trees. *American journal of botany* **93**: 1588–1600

- Domec J-C, Johnson DM** (2012) Does homeostasis or disturbance of homeostasis in minimum leaf water potential explain the isohydric versus anisohydric behavior of *Vitis vinifera* L. cultivars? *Tree physiology* **32**: 245–248
- Van Doorn WG, Hiemstra T, Fanourakis D** (2011) Hydrogel regulation of xylem water flow: an alternative hypothesis. *Plant physiology* **157**: 1642–1649
- Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Tixier A, Cochard H, Herbette S** (2013) Hydrolase treatments help unravel the function of intervessel pits in xylem hydraulics. *Physiologia plantarum*. doi: 10.1111/ppl.12092
- Dute R, Rushing R, Freeman J.** (1992) Survey of intervessel pit membrane structure in *Daphne* species. *IAWA bulletin* **13**: 111–123
- Dute R, Miller M, Carollo R** (2001) Intervascular pit structure in selected species of Thymelaeaceae. *Journal of the Alabama Academy of Science* **72**: 16–26
- Ellmore GS, Zanne AMYE, Orians CM** (2006) Comparative sectoriality in temperate hardwoods: hydraulics and xylem anatomy. *botanical Journal of the Linnean Society* **150**: 61–71
- Ennajeh M, Tounekti T, Vadel AM, Khemira H, Cochard H** (2008) Water relations and drought-induced embolism in olive (*Olea europaea*) varieties “Meski” and “Chemlali” during severe drought. *Tree physiology* **28**: 971–976
- Ewers FW, Améglio T, Cochard H, Beaujard F, Martignac M, Vandame M, Bodet C, Cruiziat P** (2001) Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree physiology* **21**: 1123–1132
- Farquhar GD, Caemmerer S Von, Berry JA** (1980) A Biochemical Model of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Leaves of C₃ Species. *Planta* **149**: 78–90
- Farrokhi N, Burton R a, Brownfield L, Hrmova M, Wilson SM, Bacic A, Fincher GB** (2006) Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant biotechnology journal* **4**: 145–167
- Fleischer A, Titel C, Ehwald R** (1998) The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *chenopodium album* L. cells. *Plant physiology* **117**: 1401–10

- Franks PJ, Drake PL, Froend RH** (2007) Anisohydric but isohydrodynamic: seasonally constant plant water potential gradient explained by a stomatal control mechanism incorporating variable plant hydraulic conductance. *Plant, cell et environment* **30**: 19–30
- Fukuda H, Komamine A** (1980) Direct Evidence for Cyto differentiation to Tracheary Elements without Intervening Mitosis in a Culture of Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant physiology* **65**: 61–64
- Fukuda H, Kobayashi H** (1989) Dynamic Organization of the Cytoskeleton during Tracheary-Element Differentiation. *Development, growth et differentiation* **31**: 9–16
- Gascó a., Gortan E, Salleo S, Nardini a.** (2008) Changes of pH of solutions during perfusion through stem segments: further evidence for hydrogel regulation of xylem hydraulic properties? *Biologia Plantarum* **52**: 502–506
- Gaufichon L, Prioul J** (2010) Quelles sont les perspectives d'amélioration génétique de plantes cultivées tolérantes à la sécheresse? Rapport FARM
- GIEC** (2007) Bilan 2007 des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II, III au quatrième rapport d'évaluation du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. 103
- Gortan E, Nardini A, Salleo S, Jansen S** (2011) Pit membrane chemistry influences the magnitude of ion-mediated enhancement of xylem hydraulic conductance in four Lauraceae species. *Tree physiology* **31**: 48–58
- Groover A, Dewitt N, Heidel A, Jones A** (1997) Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* **196**: 197–211
- Hacke UG, Sperry JS** (2001) Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **4**: 97–115
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh K a.** (2001a) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**: 457–461
- Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J, McCulloh K a** (2001c) Cavitation fatigue. Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant physiology* **125**: 779–786

- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L** (2006) Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree physiology* **26**: 689–701
- Hacke UG, Jansen S** (2009) Embolism resistance of three boreal conifer species varies with pit structure. *The New phytologist* **182**: 675–686
- Hartmann H, Ziegler W, Kolle O, Trumbore S** (2013) Thirst beats hunger - declining hydration during drought prevents carbon starvation in Norway spruce saplings. *The New phytologist*. doi: 10.1111/nph.12331
- Herbette S, Cochard H** (2010) Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant physiology* **153**: 1932–1939
- Herbette S, Wortemann R, Awad H, Huc R, Cochard H, Barigah TS** (2010) Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree physiology* **30**: 1448–55
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson a, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, et al** (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14732–14737
- Hinckley TM, Brooks JR, Cermak J, Ceulemans R, Kucera J, Meinzer FC, Roberts DA** (1993) Water flux in a hybrid poplar stand. *Tree physiology* **14**: 1005–1018
- Hoffmann W a., Marchin RM, Abit P, Lau on L** (2011) Hydraulic failure and tree dieback are associated with high wood density in a temperate forest under extreme drought. *Global Change Biology* **17**: 2731–2742
- Holbrook NM** (1995) Stem water storage. *Plant stems: physiology and functional morphology*. Academic Press incorporate, pp 151–173
- Holbrook NM, Ahrens ET, Burns MJ, Zwieniecki M a** (2001) In vivo observation of cavitation and embolism repair using magnetic resonance imaging. *Plant physiology* **126**: 27–31
- Hüsken D, Steudle E, Zimmermann U** (1978) Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant physiology* **61**: 158–163
- Van Ieperen W, van Meeteren U, van Gelder H** (2000) Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. *Journal of experimental botany* **51**: 769–776

- Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Iii WAP, Davis SD** (2005) Do Xylem Fibers Affect Vessel Cavitation Resistance ? *Plant physiology* **139**: 546–556
- Jacobsen AL, Pratt RB, Tobin MF, Hacke UG, Ewers FW** (2012) A global analysis of xylem vessel length in woody plants. *American journal of botany* **99**: 1583–1591
- Jansen S, Piesschaert F, Smets A** (2000) Wood anatomy of Elaeagnaceae, with comments on vestured pits, helical thickenings and systematic relationships. *American journal of botany* **87**: 20–28
- Jansen S, Baas P, Gasson P, Smets E** (2003) Vestured Pits: Do They Promote Safer Water Transport? *International Journal of Plant Sciences* **164**: 405–413
- Jansen S, Baas P, Gasson P, Lens F, Smets E** (2004a) Variation in xylem structure from tropics to tundra: evidence from vestured pits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8833–8837
- Jansen S, Choat B, Vinckier S, Lens F, Schols P, Smets E** (2004b) Intervascular pit membranes with a torus in the wood of *Ulmus* (Ulmaceae) and related genera. *New Phytologist* **163**: 51–59
- Jansen S, Sano Y, Choat B, Rabaey D, Lens F, Dute R** (2007) Pit membranes in tracheary elements of Rosaceae and related families : new records of tori and pseudotori. *American journal of botany* **94**: 503–514
- Jansen S, Choat B, Pletsers A** (2009) Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American journal of botany* **96**: 409–419
- Jansen S, Gortan E, Lens F, Lo Gullo MA, Salleo S, Scholz A, Stein A, Trifilò P, Nardini A** (2011) Do quantitative vessel and pit characters account for ion-mediated changes in the hydraulic conductance of angiosperm xylem? *The New phytologist* **189**: 218–228
- Jansen S, Lamy J-B, Burlett R, Cochard H, Gasson P, Delzon S** (2012) Plasmodesmatal pores in the torus of bordered pit membranes affect cavitation resistance of conifer xylem. *Plant, cell et environment* **35**: 1109–1020
- Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-laurent F, Güçlü J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schöffner AR, Bouchez D, et al** (2003) Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake. *The Plant cell* **15**: 509–522

- Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K** (2010) Immunolocalization and structural variations of xylan in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta* **232**: 817–824
- Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K** (2011) Temporal and spatial diversities of the immunolabeling of mannan and xylan polysaccharides in differentiating earlywood ray cells and pits of *Cryptomeria japonica*. *Planta* **233**: 109–122
- Ko J, Han K, Park S, Yang J** (2004) Plant Body Weight-Induced Secondary Growth in *Arabidopsis* and Its Transcription Phenotype Revealed by Whole-Transcriptome Profiling. *Plant physiology* **135**: 1069–1083
- Kocacinar F, Sage RF** (2003) Photosynthetic pathway alters xylem structure and. *Plant, Cell and Environment* **26**: 2015–2026
- Kohonen MM, Helland Å** (2009) On the Function of Wall Sculpturing in Xylem Conduits. *Journal of Bionic Engineering* **6**: 324–329
- Konrad W, Roth-nebelsick A** (2009) The influence of the wall contact angle on gas bubble behaviour in xylem conduits under tension and possible consequences for embolism. 6th Plant biomechanics Conference. Cayenne, November 2009
- Kramer PJ, Boyer JS** (1995) *Water Relations of Plants*, Academic P. New-York
- Lachaud S, Maurousset L** (1996) Occurrence of plasmodesmata between differentiating vessels and other xylem cells in *Sorbus torminalis* L . Crantz and their fate during xylem maturation. *Protoplasma* **191**: 220–226
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL** (2008) *Plant physiological ecology*, 2nd ed. 640
- Lamy J-B, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S** (2011) Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PLoS one* **6**: e23476
- Lancashire JR, Ennos a R** (2002) Modelling the hydrodynamic resistance of bordered pits. *Journal of experimental botany* **53**: 1485–1493
- Lens F, Sperry JS, Christman M a, Choat B, Rabaey D, Jansen S** (2011) Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New phytologist* **190**: 709–723

- Leplé JC, Cristina A, Brasileiro M, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Reports Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* **4**: 137–141
- Leuning R** (1995) A critical appraisal of a combined stomatal-photosynthesis model for C3 plants. *Plant, cell and environment* **18**: 339–355
- Li Y, Sperry JS, Shao M** (2009) Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 341–346
- Lu H, Zhao Y-L, Jiang X** (2004) Stable and specific expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase gene (4CL1) driven by the xylem-specific Pto4CL1 promoter in the transgenic tobacco. *Biotechnology letters* **26**: 1147–1152
- Luft JH** (1971) Ruthenium red and violet, chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anatomical Record* **171**: 347–368
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB** (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184–2199
- Maherali H, Walden AE, Husband BC** (2009) Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New phytologist* **184**: 721–731
- Mao G, Buschmann H, Doonan JH, Lloyd CW** (2006) The role of MAP65-1 in microtubule bundling during *Zinnia* tracheary element formation. *Journal of cell science* **119**: 753–758
- Mason WL, Petr M, Bathgate S** (2012) Silvicultural strategies for adapting planted forests to climate change: from theory to practice. *Journal of forest science* **6**: 265–277
- Mayr S, Beikircher B, Obkircher M-A, Schmid P** (2010) Hydraulic plasticity and limitations of alpine *Rhododendron* species. *Oecologia* **164**: 321–330
- McCutchan H, Shackel KA** (1992) Stem-water Potential as a Sensitive Indicator of Water Stress in Prune Trees (*Prunus domestica* L) . *Journal of the American for horticultural sciences* **117**: 607–611
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, et al** (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New phytologist* **178**: 719–739

- McDowell NG** (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant physiology* **155**: 1051–1059
- Mcelrone AJ, Pockman WT, Martínez-vilalta J, Jackson RB** (2004) Variation in xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytologist* **163**: 507–517
- Meinzer FC, Clearwater MJ, Guillermo G** (2001) water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 239–262
- Meinzer FC, Johnson DM, Lachenbruch B, McCulloh K a., Woodruff DR** (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* **23**: 922–930
- Meinzer FC, McCulloh K a** (2013) Xylem recovery from drought-induced embolism: where is the hydraulic point of no return? *Tree physiology* **33**: 331–334
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W** (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant molecular biology* **47**: 239–274
- Mellerowicz EJ, Sundberg B** (2008) Wood cell walls : biosynthesis , developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 293–300
- Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beeckman T** (2008) Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics* **40**: 1489–1492
- Mencuccini M, Comstock J** (1999) Variability in hydraulic architecture and gas exchange of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under well-watered conditions: interactions with leaf size. *Australian journal of plant physiology* **26**: 115–124
- Mencuccini M** (2003) The ecological significance of long-distance water transport: short-term regulation , long-term acclimation and the hydraulic costs of stature across plant life forms. *Plant, cell and environment* **26**: 163–182
- Micheli F** (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in plant science* **6**: 414–419
- Miyashima S, Sebastian J, Lee J-Y, Helariutta Y** (2013) Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO journal* **32**: 178–93

- Mølhøj M, Verma R, Reiter W-D** (2003) The biosynthesis of the branched-chain sugar d-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-d-apiose/UDP-d-xylose synthase from *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **35**: 693–703
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *physiologia plantarum* **15**: 473–497
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* **2**: 279–289
- Nardini A, Gascó A, Cervone F, Salleo S** (2007) Reduced content of homogalacturonan does not alter the ion-mediated increase in xylem hydraulic conductivity in tobacco. *Plant physiology* **143**: 1975–1981
- Nardini A, Salleo S, Jansen S** (2011) More than just a vulnerable pipeline: xylem physiology in the light of ion-mediated regulation of plant water transport. *Journal of experimental botany* **62**: 4701–18
- Nicotra a B, Atkin OK, Bonser SP, Davidson a M, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, et al** (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant science* **15**: 684–692
- Nieminen KM, Kauppinen L, Molecular P, Plant U** (2004) Update on Xylem Development A Weed for Wood ? *Arabidopsis* as a Genetic Model. **135**: 653–659
- Nobel P** (1999) *Plant physiology*, Academic P. 489
- Nobel P** (1991) Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4 plants. *New Phytologist* **119**: 183–205
- O'Neill M a, Eberhard S, Albersheim P, Darvill a G** (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* **294**: 846–9
- Oda Y, Fukuda H** (2012) Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 38–44
- Ogasa M, Miki NH, Murakami Y, Yoshikawa K** (2013) Recovery performance in xylem hydraulic conductivity is correlated with cavitation resistance for temperate deciduous tree species. *Tree physiology* **33**: 335–44

- Olson ME, Rosell J a** (2013) Vessel diameter-stem diameter scaling across woody angiosperms and the ecological causes of xylem vessel diameter variation. *New phytologist* **197**: 1204–13
- ONF** La forêt, les quatres éléments.
http://www.onf.fr/gestion_durable/sommaire/milieu_vivant/ecosysteme/elements/20070925-125832-941037/@@index.html
- Oskolski AA, Jansen AES, Meryta AAA** (2009) Distribution of scalariform and simple perforation plates within the vessel network in secondary xylem of Araliaceae and its implications for wood evolution. *Plant systematics and evolution* **278**: 43–51
- Pammenter NW, Vander Willigen C** (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree physiology* **18**: 589–593
- Parkhurst BYDF** (1994) Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist* **126**: 449–479
- Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ** (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in plant science* **12**: 267–77
- Pérez-Donoso AG, Sun Q, Roper MC, Greve LC, Kirkpatrick B, Labavitch JM** (2010) Cell wall-degrading enzymes enlarge the pore size of intervessel pit membranes in healthy and *Xylella fastidiosa*-infected grapevines. *Plant physiology* **152**: 1748–59
- Pittermann J, Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK, Sikkema EH** (2005) Torus-margo pits help conifers compete with angiosperms. *Science* **310**: 1924
- Pittermann J, Sperry JS, Wheeler JK, Hacke UWEG, Sikkema EH** (2006) Mechanical reinforcement of tracheids compromises the hydraulic efficiency of conifer xylem. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1618–1628
- Pittermann J** (2010) The evolution of water transport in plants: an integrated approach. *Geobiology* **8**: 112–39
- Pittermann J, Choat B, Jansen S, Stuart S a, Lynn L, Dawson TE** (2010) The relationships between xylem safety and hydraulic efficiency in the Cupressaceae: the evolution of pit membrane form and function. *Plant physiology* **153**: 1919–31
- Plavcová L, Hacke UG** (2011) Heterogeneous distribution of pectin epitopes and calcium in different pit types of four angiosperm species. *New phytologist* **192**: 885–97

- Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS** (2011) Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant, cell et environment* **34**: 501–13
- Plavcová L, Hacke UG** (2012) Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. *Journal of experimental botany* **63**: 695–709
- Plomion C, Stokes A, France CP, Rhe L De** (2001) Wood Formation in Trees. *Plant physiology* **127**: 1513–1523
- Pockman WT, Sperry JS** (2000) Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of sonoran desert vegetation. *American journal of botany* **87**: 1287–1299
- Pratt RB, Jacobsen a L, Ewers FW, Davis SD** (2007) Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New phytologist* **174**: 787–798
- Rabaey D, Huysmans S, Lens F, Smets E, Jansen S** (2008a) Micromorphology ans systematic distribution of pit membrane thickening in Oleaceae: tori and pseudo tori. *IAWA Journal* **29**: 409–424
- Rabaey D, Lens F, Huysmans S, Smets E, Jansen S** (2008b) A comparative ultrastructural study of pit membranes with plasmodesmata associated thickenings in four angiosperm species. *Protoplasma* **233**: 255–62
- Reuhs BL, Glenn J, Stephens SB, Kim JS, Christie DB, Glushka JG, Zablackis E, Albersheim P, Darvill AG, O'Neill M a** (2004) l-Galactose replaces l-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the l-fucose-deficient mur1 Arabidopsis mutant. *Planta* **219**: 147–57
- Roure A** (2007) Conception et réalisation d'une collection de vecteurs gateway pour l'étude fonctionnelle d'ORF et de région cis-regulatrices. Rapport d'étude
- Sack L, Holbrook NM** (2006) Leaf hydraulics. *Annual review of plant biology* **57**: 361–81
- Saha S, Holbrook NM, Montti L, Goldstein G, Cardinot GK** (2009) Water relations of *Chusquea ramosissima* and *Merostachys clausenii* in Iguazu National Park, Argentina. *Plant physiology* **149**: 1992–1999


- Salleo S, Nardini A, Pitt F, Gullo M a. Lo** (2000) Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in Laurel (*Laurus nobilis* L.). *Plant, Cell and Environment* **23**: 71–79
- Sano Y** (2005) Inter and intraspecific structural variations among intervacular pit membranes as revealed by field-emission scanning electron microscopy. *American journal of botany* **92**: 1077–1084
- Sano Y, Jansen S** (2006) Perforated pit membranes in imperforate tracheary elements of some angiosperms. *Annals of botany* **97**: 1045–53
- Sano Y, Morris H, Shimada H, Ronse De Craene LP, Jansen S** (2011) Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Annals of botany* **107**: 953–64
- Schmid R** (1965) Fine pits in hardwoods. *In* C WA, ed, *Cellular ultrastructure of woody plants*, Syracuse U. New-York, pp 291–304
- Schmid R, Machado P** (1968) Pit Membranes in Hard woods - Fine Structure and Development. *Protoplasma* **66**: 185–204
- Schmitz N, Jansen S, Verheyden A, Kairo JG, Beeckman H, Koedam N** (2007) Comparative anatomy of intervessel pits in two mangrove species growing along a natural salinity gradient in Gazi bay, Kenya. *Annals of botany* **100**: 271–81
- Scholz A, Rabaey D, Stein A, Cochard H, Smets E, Jansen S** (2013) The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree physiology* **33**: 684–94
- Schuetz M, Smith R, Ellis B** (2012) Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of experimental botany* 1–21
- Schulte PJ** (1999) Water flow through a 20-pore perforation plate in vessels of *Liquidambar styraciflua*. **50**: 1179–1187
- Schultz HR** (2003) Differences in hydraulic architecture account for near- isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. 1393–1405
- Shackel K a, Brinckmann E** (1985) In Situ Measurement of Epidermal Cell Turgor, Leaf Water Potential, and Gas Exchange in *Tradescantia virginiana* L. *Plant physiology* **78**: 66–70

- Shao H-B, Chu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X** (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes rendus biologiques* **331**: 215–25
- Siedlecka A, Wiklund S, Péronne M-A, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz EJ** (2008) Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant physiology* **146**: 554–65
- Sperry JS, Tyree MT** (1988) Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant physiology* **88**: 581–7
- Sperry JS** (2003) Evolution of water transport and xylem structure. *International journal of plant science* **164**: 115-127
- Sperry JS, Hacke UG** (2004) Analysis of circular bordered pit function. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American journal of botany* **91**: 369–385
- Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK** (2005) Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant, Cell and Environment* **28**: 456–465
- Sperry JS, Hacke UG, Feild TS, Sano Y, Sikkema EH** (2007) Hydraulic Consequences of Vessel Evolution in Angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* **168**: 1127–1139
- Sperry JS, Christman M a, Torres-Ruiz JM, Taneda H, Smith DD** (2012) Vulnerability curves by centrifugation: is there an open vessel artefact, and are “r” shaped curves necessarily invalid? *Plant, cell et environment* **35**: 601–10
- Sperry J** (2013) Cutting-edge research or cutting-edge artifact? An overdue control experiment complicates the xylem refilling story. *Plant, cell et environment*. doi: 10.1111/pce.12148
- Steudle E** (2000) Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and soil* **226**: 45–56
- Stiller V, Sperry JS** (2002) Cavitation fatigue and its reversal in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of experimental botany* **53**: 1155–61
- Stiller V, Lafitte HR, Sperry JS** (2003) Hydraulic Properties of Rice and the Response of Gas Exchange to Water Stress. *Plant physiology* **132**: 1698–1706
- Szarek S., Ting IP** (1975) photosynthetic efficiency of cam plants in relation to C3 and C4 plants. *Environmental and Experimental Biological Control of photosynthesis* 289–297
- Taiz L, Zeiger E** (2010) *Plant physiology*. 5th edition. www.plantphys.net, accessed 22/10/2013

- Tardieu F, Simonneau T** (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of experimental botany* **49**: 419–432
- Thomas RJ** (1972) Bordered pit aspiration in angiosperms. *Wood and Fiber* **3**: 236–237
- Tognetti R, Longobucco A, Raschi A** (1999) Seasonal embolism and xylem vulnerability in deciduous and evergreen Mediterranean trees influenced by proximity to a carbon dioxide spring. *Tree physiology* **19**: 271–277
- Touchette BW, Iannacone LR, Turner GE, Frank AR** (2007) Drought tolerance versus drought avoidance: A comparison of plant-water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* **27**: 656–667
- Turner NC** (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* **366**: 339–366
- Turner SR, Somerville CR** (1997) Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *The Plant cell* **9**: 689–701
- Turner S, Gallois P, Brown D** (2007) Tracheary element differentiation. *Annual review of plant biology* **58**: 407–33
- Tyree MT, Sperry JS** (1989) Cavitation and embolism. *Annual review of plant physiology and molecular biology* **40**: 19–38
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H** (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal* **15**: 335–360
- Tyree MT, Zimmermann MH** (2002) *Xylem structure and the ascent of sap*, Springer-V. New-York
- Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V** (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in genetics* **20**: 375–83
- Urli M, Porté AJ, Cochard H, Guengant Y, Burlett R, Delzon S** (2013) Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree physiology* **1–12**
- Vincken J, Schols HA, Oomen RJFJ, Mccann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF** (2003) If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I . Implications for Cell Wall Architecture. *Plant physiology* **132**: 1781–1789

- Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, Kitin P, Strauss SH** (2011) Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant, cell and environment* **34**: 655–668
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N** (2005) Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, cell and environment* **28**: 800–812
- Wheeler E, Baas P, Rodgers S** (2007) Variations in dicot wood anatomy: a global analysis based on the insidewood database. *IAWA Journal* **28**: 229–258
- Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A, Gomory D, Roeckel-Drevet P, Cochard H** (2011) Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree physiology* **31**: 1175–1182
- Xu Z, Zhou G** (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of experimental botany* **59**: 3317–3325
- Yang F, Mitra P, Zhang L, Prak L, Verhertbruggen Y, Kim J-S, Sun L, Zheng K, Tang K, Auer M, et al** (2013) Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant biotechnology journal* **11**: 325–335
- Zhang GF, Staehelin A** (1992) Functional compartmentation of the golgi apparatus of plant cells. *Plant physiology* **99**: 1070–1083
- Zimmermann MH** (1978) Hydraulic architecture of some diffuse-porous trees. *Canadian Journal of Botany* **56**: 2286–2295
- Zimmermann MH** (1983) Xylem structure and the ascent of sap, Springer-V. Berlin
- Zweypfenning RCVJ** (1978) A hypothesis on the function of vessel pits. *IAWA bulletin* 13–15
- Zwieniecki M a, Melcher PJ, Michele Holbrook NM** (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* **291**: 1059–62
- Zwieniecki M a., Holbrook NM** (2001) Diurnal variation in xylem hydraulic conductivity in white ash (*Fraxinus americana*), red maple (*Acer rubrum* L.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg). *Plant, cell and environment* **21**: 1173–1180
- Zwieniecki M a, Holbrook NM** (2009) Confronting Maxwell’s demon: biophysics of xylem embolism repair. *Trends in plant science* **14**: 530–4

ANNEXES

| | | |
|---|-------------------------------|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-005 |
| | Mini-Préparation d'ADN | Version : 1 Date : 06/09/2011 Page : 1/6 |

1. Objet et domaine d'application

Mini-Préparation d'ADN plasmidique. Extraction d'ADN à partir de bactéries transformées contenant un plasmide d'intérêt. Obtenir du vecteur recombinant rapidement en quantité et qualité suffisante pour le séquençage du fragment d'intérêt.

2. Documents de référence

Demande d'agrément n° **5061**.

Mode d'emploi centrifugeuse Sigma et Eppendorf.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Manipulation restreinte aux personnes mentionnées dans la demande d'agrément pour la manipulation d'organismes génétiquement modifiées.

4. Hygiène et sécurité

Manipulation d'**Organismes Génétiquement Modifiés**, respecter les règles énoncées dans la demande d'agrément.

- Manipuler les bactéries sous la hotte à flux laminaire
- Désinfecter à l'eau de javel 12° chlorée tout le matériel qui a été en contact avec les bactéries
- Jeter les déchets bactériens dans la poubelle prévue à cet effet : ceux-ci seront stérilisés dans un autoclave 30 minutes à 120°C.

Penser à consulter les fiches de sécurité relatives aux différents produits ou consulter l'agent chargé de prévention du service

Porter une blouse et des gants adaptés à l'usage des produits

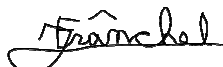


5. Principe de la méthode

La lyse alcaline est la méthode la plus commune pour lyser la cellule bactérienne en vue de la purification de plasmides.

La méthode se déroule en plusieurs étapes :

a) Solubilisation du culot de cellules bactériennes

Après centrifugation, le milieu de culture est éliminé et les bactéries culottées sont reprises dans une solution contenant du glucose pour la pression osmotique (évite que les bactéries éclatent), du tris pour le pH, de l'EDTA pour inhiber les Dnases, et de Lysozyme pour détruire la paroi bactérienne. Cette étape est importante : une bonne suspension conditionne le nombre de bactéries qui seront lysées et donc la quantité de plasmides purifiés.

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | FRANCHEL Jérôme | LABERNIA Sylvaine | JULIEN Jean-Louis |
| Fonction : | IE | ADT | PR, DU |
| Visa : |  |  |  |

Mini-Préparation d'ADN

b) Lyse

Les cellules bactériennes sont lysées avec un tampon NaOH/SDS. Le SDS solubilise les composants phospholipidiques et protéiques des membranes cellulaires permettant ainsi la libération du contenu cellulaire. Le NaOH dénature les ADN chromosomiques et plasmidiques et les protéines. La lyse ne doit jamais durer plus de 5 minutes : une incubation de 5 minutes maximum permet la libération de l'ADN plasmidique de la cellule alors qu'elle minimise celle de l'ADN chromosomique. De plus elle réduit l'exposition du plasmide aux conditions dénaturantes.

c) Neutralisation

Pour neutraliser la réaction de lyse on utilise une solution d'acétate de potassium acide (pH=5,5). Une forte concentration en potassium dodécyl sulfate permet la précipitation des complexes sel-détergent : protéines dénaturés, ADN chromosomique, débris cellulaires. L'ADN plasmidique (circulaire) se renature correctement et rapidement et reste donc en solution.

d) Clarification du lysat

Une centrifugation à haute vitesse permet de précipiter les débris et de prélever le surnageant contenant l'ADN plasmidique en solution

e) Purification

La solution de phénol/chloroforme va permettre d'éliminer les traces de protéines. Le chloroforme permet ensuite d'éliminer les traces de phénol restantes.

f) Précipitation à l'isopropanol et lavages alcooliques

L'isopropanol et la centrifugation permet la précipitation des ADN pour former un culot qui est ensuite lavé des impuretés restantes avec de l'alcool.

g) Reprise des culots

6. Matériels nécessaires

Centrifugeuse (**Lire le mode d'emploi avant la première utilisation**)

Cure-dent

Etuve à 37°C

Gants nitrile et latex

Glace (Machine à glace)

Hotte à flux laminaire

Incubateur agitant

Lunettes de protection

Micropipette et pointes de pipettages

Microtubes 1,5 mL et 2 mL

Sorbonne

Tubes de culture et portoir

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Bactérie avec plasmide à purifier

Boîte de Pétri avec milieu LB + Ampicilline
ou autre antibiotique

Eau ultra-pure

Ethanol 70%

Tube avec 3 mL de milieu LB liquide +
Ampicilline ou autre antibiotique

RNase A

| Produits Chimiques | Numéro CAS | CMR, OHB et autres dangers | | | Recommandations : conditions de stockage, d'utilisation, d'élimination... |
|-----------------------------------|------------|----------------------------|---|------------|--|
| Phénol | 108-95-2 | M3 | 3 | SK C | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants nitrile et écran ou protection oculaire Eliminer dans la bouteille dédiée |
| Chloroforme | 67-66-3 | C3 | 3 | SK C SD | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants nitrile et écran ou protection oculaire Eliminer dans la bouteille dédiée |
| EDTA disodium | 6381-92-6 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Tris, trométhamine, trométamol | 77-86-1 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| NaOH, soude caustique | 1310-73-2 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| EDTA | 60-00-4 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| SDS, sodium dodécylsulfate | 151-21-3 | | 2 | SK C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Acide acétique | 64-19-7 | | 2 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| KOAc, acétate de potassium | 127-08-2 | | 2 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Isopropanol, alcool isopropylique | 67-63-0 | | 1 | C ST | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants nitrile et écran ou protection oculaire |
| Ethanol, alcool éthylique | 64-17-5 | | 1 | | |

Indications :

OHB : de 1 (faible) à 6 (élevée)

SK ou C : port de protection cutanée et oculaire indispensable

G : manipulation déconseillée pendant la grossesse

A : manipulation déconseillée en cas d'allaitement maternel

Pondération de la durée d'exposition : **ST** impossible, **SD** limitée

8. Contraintes de la méthode

La culture des bactéries en milieu liquide dure une nuit. Lors d'une Mini-Préparation à partir d'un stock glycérol il est préférable de refaire une strie sur une boîte de LB avant de lancer la culture liquide ce qui rajoute encore 1 jour. Il faut donc s'y prendre 2 jours à l'avance.



9. Contenu du mode opératoire

a) Composition des solutions

Tampon I (ou tampon GTE)

Mode opératoire :

Dans un bécher mettre 200 mL d'eau puis verser les différentes poudres. Après dissolution ajuster le pH à 8 et compléter avec de l'eau UP au volume final souhaité. Verser la solution dans un flacon et autoclaver 20 minutes à 120°C, conserver à 4°C.

Extemporément, dissoudre 4 mg de lysozyme dans 1 mL et stocker sur la glace jusqu'à utilisation.

Pour 250 mL de solution :

| | Conc. finale | PM | Masse |
|---------------------|--------------|--------|--------|
| Glucose | 50 mM | 180,16 | 2,25 g |
| Tris-HCl | 25 mM pH8 | 211,1 | 0,76 g |
| EDTA | 10 mM pH8 | 372,24 | 0,93 g |
| H ₂ O UP | qsp | | 250 mL |

Tampon II (ou tampon de lyse)

A préparer extemporément 3 mL suffisent pour 10 Mini-Préparations.

Ne pas mettre ce tampon dans la glace (précipitation du SDS).

Pour 3 mL de solution :

| | Conc. finale | Conc. Sol mère | Volume |
|---------------------|--------------|----------------|---------|
| H ₂ O UP | | | 2,64 mL |
| NaOH | 0,2 M | 10 M | 60 µL |
| SDS | 1 % | 10 % | 300 µL |

Tampon III (ou tampon high salt)

Pour 250 mL de solution :

| | Conc. finale | Conc. Sol mère | Volume |
|------------------------|--------------|----------------|----------|
| Acétate de potassium | 3 M | 5 M | 150 mL |
| Acide acétique glacial | 1,8 M | | 28,75 mL |
| H ₂ O UP | qsp | | 250 mL |

Mode opératoire :

Verser le volume d'acétate de potassium 5 M dans un bécher puis ajuster le pH à une valeur de 5,5 en ajoutant de l'acide acétique en assez grande quantité (volume d'environ 29 mL). Verser la solution dans une éprouvette et compléter avec de l'eau ultra-pure pour avoir le bon volume. Conserver à 4°C.

b) Mise en culture des bactéries

Sous la hotte à flux laminaire, faire une strie sur une boîte de Pétri contenant du LB Agar et l'antibiotique correspondant.

↓
Incuber 24 h à 37 °C.



Mini-Préparation d'ADN

Sous la hotte à flux laminaire, prélever une colonie isolée et ensemercer un tube contenant 3 mL de LB liquide supplémentée de l'antibiotique correspondant.

Incuber une nuit à 37 °C avec une agitation de 200 rotations par minutes (rpm).

c) Extraction de l'ADN

Sous la hotte à flux laminaire, prélever 2 mL de culture dans un tube Eppendorf
Centrifuger 10 min à 1 500 rcf à 4 °C

Eliminer le surnageant (**dans une bouteille**) et recommencer avec le reste de culture

Eliminer le surnageant en versant le tube (**dans une bouteille contenant de la javel**)
et pipetter le reste de LB avec la P200

Resuspendre le culot dans 300 µL de solution I additionnée de lysozyme
Vortexer jusqu'à complète dissolution du culot

Ajouter 300 µL de solution II 0,2 N NaOH + 1 % SDS
(solution à préparer juste avant emploi)
Retourner 10 fois le tube et incuber **maximum 5 minutes** dans la glace
(Attention pas plus)

Ajouter 300 µL de solution III et retourner immédiatement 10 fois

Laisser 10 min dans la glace
Centrifuger 10 min à 13 500 rcf à 4 °C

Transférer 800 µL de surnageant dans un nouveau tube

Mettre des gants nitrile et sous la sorbonne, ajouter 1 volume de
Phénol/Chloroforme
Centrifuger 2 min à 16 100 rcf à 4 °C

Mettre des gants nitrile et sous la sorbonne, récupérer 700 µL de surnageant et
ajouter 1 volume de Chloroforme
Centrifuger 2 min à 16 100 rcf à 4 °C

Mettre des gants et sous la sorbonne, transférer 600 µL de surnageant dans tube
contenant déjà 600 µL d'isopropanol
Laisser 2 min à température ambiante
Centrifuger 20 min à 16 100 rcf à 4 °C

Enlever le surnageant
Ajouter 400 µL d'éthanol 70 % à -20 °C
Centrifuger 5 min à 1 000 rcf

Enlever le surnageant

Mini-Préparation d'ADN

Ajouter 400 μ L d'éthanol 70 % à -20 °C
Centrifuger 5 min à 1 000 rcf



Enlever le surnageant et faire sécher




Reprendre le culot dans 20 μ L d'eau contenant 100 μ g/mL de RNase A

d) Vérification de l'extraction

La quantité et la qualité de l'ADN plasmidique extrait est déterminé par spectrophotométrie UV et analyse sur gel d'agarose (MO-MET-003).

La digestion des plasmides extraits par des enzymes de restriction, le séquençage ou l'hybridation avec une sonde homologue permettra l'identification des clones présentant l'insert attendu.

| | | |
|---|--------------------------------|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-006 |
| | Extraction d'ARN totaux | Version : 1.1 Date : 06/09/2011 Page : 1/6 |

1. Objet et domaine d'application

Obtenir des ARN de très bonne qualité et en quantité suffisante pour des analyses microarrays, QRT-PCR ou RT-PCR à partir d'une petite quantité d'échantillons végétaux (peuplier, hévée, noyer...)

2. Documents de référence

Chang S, Puryear J & Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**(2) 113-116

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tout personnel voulant réaliser une extraction d'ARN.

4. Hygiène et sécurité

Les solvants sont toxiques pour les voies respiratoires, la peau et les yeux.
Donc :

- travailler sous la sorbonne lors de l'utilisation des solvants
- mettre une blouse et des gants adaptés (en nitrile pour l'utilisation du chloroforme)
- travailler derrière un écran ou porter des lunettes de protection

Penser à consulter les fiches de sécurité relatives aux différents produits ou consulter l'agent chargé de prévention du service (Nicole BRUNEL).

5. Principe de la méthode




Pour extraire les ARN totaux de matériel végétal (feuilles, tiges, racines...) une lyse cellulaire est réalisée à l'aide de moyens physiques et chimiques. Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide (MO-MET-001) puis soumis à un certain nombre de traitements :

- solubilisation des membranes cellulaires par le tampon d'extraction
- purification de l'ARN à l'aide de chloroforme/alcool isoamylique : élimination des protéines
- précipitation des ARN au chlorure de lithium
- lavage du culot à l'éthanol pour éliminer les sels
- action de la DNase pour éliminer toute trace d'ADN
- purification de l'ARN à l'aide du tampon SSTE et de chloroforme/alcool isoamylique
- lavage du culot à l'éthanol pour éliminer les sels

6. Matériels nécessaires

Bac à glace
Bain marie/Bloc chauffant à 65°C
Centrifugeuse réfrigérante équipée d'un rotor pour microtubes (**Lire le mode d'emploi avant la première utilisation**)
Congélateur -20°C et -80°C

Gants, Lunettes de protection
Micropipettes et pointes de pipettage
Microtubes de 2 mL et de 1,5 mL
Nanodrop
Réfrigérateur
Sorbonne

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | FRANCHEL Jérôme | LABERNIA Sylvaine | JULIEN Jean-Louis |
| Fonction : | IE | ADT | PR, DU |
| Visa : |  |  |  |

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

| | |
|---|---|
| Tampon d'extraction | Ethanol 100% |
| Tampon SSTE | Ethanol 70% |
| Chlorure de lithium (8 ou 10 M) | DNase "RQ1 RNase-Free DNase" et son |
| Chloroforme / Alcool isoamylique (24/1) | Tampon 10 X (Promega) |
| Eau stérile | RNasine "RNasin® Plus RNase Inhibitor" (Promega) |

| Produits Chimiques | Numéro CAS | CMR, OHB et autres dangers | | | Recommandations : conditions de stockage, d'utilisation, d'élimination... |
|--|--------------|----------------------------|-----------|--------------|---|
| Chloroforme | 67-66-3 | C3 | 3 | SK C | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants nitrile et écran ou protection oculaire ; Eliminer dans la bouteille dédiée |
| β-mercaptoéthanol | 60-24-2 2 | | 3 | SK C | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants et écran ou protection oculaire |
| CTAB | 57-09-0 | | 3 | SK C | Port de gants et protection oculaire |
| CaCl ₂ , chlorure de calcium | 10034-52-4 | | 3 | C | Port de gants et protection oculaire |
| LiCl, chlorure de lithium | 7447-41-8 | | 2 | C G A | Port de gants et protection oculaire |
| SDS, sodium dodécylsulfate | 151-21-3 | | 2 | SK C | Port de gants et protection oculaire |
| EDTA disodium | 6381-92-6 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Tris, trométhamine | 77-86-1 | | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| PVP, polyvinylpyrrolidone | 9003-39-8 | | 2 | | Port de gants et protection oculaire |
| Alcool isoamylique | 123-51-3 | | 1 | C | Stockage et manipulation sous sorbonne Port de gants nitrile et écran ou protection oculaire ; Eliminer dans la bouteille dédiée |
| Ethanol | 64-17-5 | | 1 | | |
| MgSO ₄ , sulfate de magnésium | 7487-88-9 | | NP | | |
| NaCl, chlorure de sodium | 7647-14-5 | | NP | | |

Indications :

OHB : de 1 (faible) à 6 (élevée)

SK ou C : port de protection cutanée et oculaire indispensable

G : manipulation déconseillée pendant la grossesse

A : manipulation déconseillée en cas d'allaitement maternel

Pondération de la durée d'exposition : **ST** impossible, **SD** limitée

8. Contraintes de la méthode

- Travailler dans la glace
- Il est indispensable de manipuler tout le matériel qui sera au contact avec les ARN avec des gants pour éviter la contamination par les RNAses humaines
- Besoin de bloc chauffant à 65°C
- Manipulation sur 2 jours



9. Contenu du mode opératoire

a) Préparation des solutions :

Tampon d'extraction (50 ml)

Ordre de dissolution : eau + CTAB (5s au monde) + PVP (5s au monde) + Tris + EDTA + NaCl

| | | |
|---|-----------------------|--------|
| 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) | (poudre) | 1 g |
| 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone K29-32) | (poudre) | 1 g |
| 100 mM Tris HCl (pH 8) | (solution mère 1 M) | 5 mL |
| 25 mM EDTA (pH 8) | (solution mère 0,5 M) | 2,5 mL |
| 2 M NaCl | (solution mère 5 M) | 20 mL |
| H ₂ O (qsp 50 mL) | | 21 mL |
| Autoclaver 20 min à 120°C | | |
| 3% β-mercaptoéthanol (<i>à ajouter extemporanément dans l'aliquote qui sera utilisé, sous la sorbonne</i>) | (solution) | 1,5 mL |

Garder à température ambiante

Tampon SSTE (50 ml)

Mélanger dans l'ordre suivant :

| | | |
|------------------------------|--------------------------|---------|
| H ₂ O (qsp 50 mL) | | 36,9 mL |
| 10 mM Tris HCl (pH 8) | (solution mère 1 M pH 8) | 500 µL |
| 1 mM EDTA (pH 8) | (solution mère 0,5 M) | 100 µL |
| 1 M NaCl | (solution mère 5 M) | 10 mL |
| 0.5% SDS | (solution mère 10%) | 2,5 mL |

Garder à température ambiante

Chlorure de lithium (50 ml)

| | | |
|---|----------|---------|
| 10 M LiCl (MM 42,38 g mol ⁻¹) | (poudre) | 21,19 g |
| Eau (qsp 50 mL) | | |

Garder à température ambiante

Attention réaction très exothermique

Tampon 10 X DNase RQ1 RNase-free DNase (Promega – M6101) (5 ml)

Vérifier dans le stock s'il reste du produit (livré avec l'enzyme mais utilisé en plus grande proportion au laboratoire), sinon en refaire comme décrit ci-dessous.

| | | |
|--|--------------------------|-----------|
| 400 mM Tris HCl (pH 8) | (solution mère 1 M pH 8) | 2 mL |
| 100 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O (MM 246,5) | (poudre) | 0,12325 g |
| 10 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O (MM 147) | (poudre) | 0,00735 g |
| Eau (qsp 5 mL) | | |

Filter la solution sous la hotte (Filtre 0,45 µm).

Aliquoter et garder à -20°C.

b) Extraction des ARN :

- Pour l'ensemble de la manipulation, utiliser des **gants en latex ou nitrile** et une **blouse**
- Broyer dans de l'azote liquide 0,5-2 g de matériel végétal (*ou prendre poudre à -80°C*)
 - MO-MET-001
- Transvaser le broyat dans x tubes Eppendorf 2 mL de manière à remplir 1/3 du tube
- Ajouter 1 mL tampon d'extraction (*vérifier l'ajout de β -mercaptoéthanol ; **sous la sorbonne***) et poser dans la glace
- Vortexer vigoureusement
- Incuber 5 min à 65°C, mélanger délicatement régulièrement
- Laisser 1 min à température ambiante
- **Sous la sorbonne** : ajouter 1 volume* (*1 mL*) de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) et fermer les tubes hermétiquement
- Mélanger par inversion
- Centrifuger [16 100 rcf, 20 min, 4°C]
- **Sous la sorbonne** : Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf 2 mL
- **Sous la sorbonne** : Renouveler l'opération avec 1 volume* (*1 mL*) de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) et fermer les tubes hermétiquement
- Mélanger par inversion
- Centrifuger [16 100 rcf, 10 min, 4°C]
- **Sous la sorbonne** : Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf 1,5 mL
- Calibrer le volume final à 1 mL avec de l'eau "RNase Free" (*s'aider des graduations sur l'Eppendorf*)
- Précipiter les ARNtx par 250 μ L de LiCl 10 M (2 M final) ou 333 μ L de LiCl 8 M (2M final)
- Mélanger par inversion et incuber la nuit à 4°C

-
- Centrifuger [16 100 rcf, 45 min, 4°C]
 - Eliminer le surnageant (*finir avec un pipetman*)
 - Laver le culot avec 500 μ L d'éthanol 70% à -20°C
 - Centrifuger [16 100 rcf, 5 min, 4°C]
 - Eliminer le surnageant et laver le culot avec 500 μ L d'éthanol 70% à -20°C
 - Centrifuger [16 100 rcf, 5 min, 4°C]

Extraction d'ARN totaux


- Eliminer le surnageant puis évaporer** les traces d'alcool en laissant les culots 10 min dans la glace ou 2 à 3' à minutes à température ambiante
- Solubiliser doucement le culot dans 25 µL d'eau RNase free (*si plusieurs tubes contiennent le même type d'ARN alors utiliser les 25 µL pour reprendre le culot des autres tubes*)
- Ajouter 5 µL de Mix : 3 µL tampon DNase 10X, 1 µL de RNasine (40 U) et 1 µL de DNase (1 U)
- Mélanger (*en tapotant le fond du tube*) et laisser 15 min à température ambiante***
- Purifier les acides nucléiques avec 400 µL de tampon SSTE
- Mélanger doucement 2 minutes
- **Sous la sorbonne** : Ajouter 1 volume (500 µL) de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) et fermer les tubes hermétiquement
- Mélanger par inversion
- Centrifuger [16 100 rcf, 10 min, 4°C]
- **Sous la sorbonne** : récupérer le surnageant dans un Eppendorf 1,5 mL
- Ajouter 2 volumes (1 mL) d'éthanol 100%
- Précipiter 2 heures à -20°C (*ou 20 min à -80°C*)
- Centrifuger [16 100 rcf, 45 min, 4°C]
- Eliminer le surnageant
- Laver par 500 µL d'éthanol 70%, centrifuger [16 100 rcf, 5 min, 4°C], éliminer le surnageant
- Laver par 500 µL d'éthanol 70%, centrifuger [16 100 rcf, 5 min, 4°C], éliminer le surnageant
- Laver par 500 µL d'éthanol 70%, centrifuger [16 100 rcf, 5 min, 4°C], éliminer le surnageant (*finir avec un pipetman*)
- Evaporer** les traces d'alcool 10 min dans la glace ou 2 à 3' à température ambiante
- Solubiliser très délicatement le culot dans 20 à 50 µL d'eau "RNase free" (*volume à apprécier selon la quantité du culot*)

Remarques :

* Remplir les tubes au max afin de les équilibrer (par défaut) entre eux pour la centrifugation.

** Ne pas sécher le culot totalement, celui-ci sera d'autant plus difficile à dissoudre. Par ailleurs les traces d'alcool résiduelles seront éliminées lors de l'étape de dénaturation de reverse transcription.

*** Il est important de ne pas excéder les paramètres 15 min et 25°C afin d'éviter toute hydrolyse Mg²⁺-dépendante des ARNtx (en particulier ARNm) (Mg²⁺ contenu dans le tampon DNase).

| | | |
|---|--------------------------------|---|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-006 |
| | Extraction d'ARN totaux | Version : 1.1 Date : 06/09/2011 Page : 6/6 |

c) Contrôles des quantités et qualités des ARNtx

Apprécier les quantités et puretés des ARNtx par spectrophotométrie (230, 260, 280, 320 nm) au Nanodrop :

- Déposer 1-1,5 µL d'ARNtx
- Pureté vis-à-vis des polyphénols et polysaccharides, rapport 260/230 compris entre 1,8 et 2,1
- Pureté vis-à-vis des protéines, rapport 260/280 \geq 1,8 (non aberrant si rapport $>$ 2)
- 1 unité DO à 260 nm correspond à 40 µg.mL⁻¹ d'ARNtx

Visualiser la qualité sur gel TAE[0.5X]-agarose[2 %] (dépôt de 0,5 µg pour grand peigne, ou 0,2 µg pour petit peigne) migration 150V sur 3 cm max, révélation au SYBR Safe (MO-MET-003).

S'assurer que les échantillons soient exempts de contamination d'ADN génomique par la réalisation d'une amplification PCR sur les échantillons d'ARNtx (ne pas oublier d'intégrer des contrôles PCR positif et négatif).

Réaliser un aliquot d'ARNtx à 0.5 µg.µL⁻¹ ; cet aliquot constituera le matériel support pour les études ultérieures (reverse transcription, etc).
Stocker les solutions mères et aliquots à -80°C.

Remarques :

Protocole testé et efficace sur :

Noyer = tiges.

Peuplier = racines, feuilles jeunes et sénescents, tiges (phloème, xylème), apex.

Hévée = feuilles, nécroses de *Corynespora cassicola*.

| | | |
|---|-------------------------------------|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-007 |
| | RT-PCR Production d'ADNc | Version : 1 Date : 06/09/2011 Page : 1/4 |

1. Objet et domaine d'application

Production d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN messagers (ARNm). Nécessaire avant de réaliser une PCR classique ou quantitative. Application dans l'étude de l'expression d'un gène et la caractérisation d'un gène (approche gène candidat).

2. Documents de référence

HILBERT Jean-Louis et TAGU Denis ; PCR sur ARNm : RT-PCR. Principes des techniques de biologie moléculaire, Ed. Denis TAGU, INRA Editions, 1999, p.65-66.

SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Cat. No: 18080-051)

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tout personnel voulant produire des ADNc.

4. Hygiène et sécurité

La manipulation d'ARN nécessite l'utilisation de gants et de travailler dans la glace. Les différents produits utilisés doivent être décongelés dans la glace. Porter **une blouse et des gants** pour manipuler le BET.

5. Principe de la méthode

La technique RT-PCR permet la production d'ADNc utilisé pour la détection et la mise en évidence de l'accumulation d'un ARNm dans un tissu, un organe ou une cellule notamment à la suite de différents traitements (ex : blessure, infection par un pathogène,...).

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les transcrire in vitro en ADNc simple-brin grâce à l'action de la transcriptase reverse. Les molécules obtenues servent alors de matrice à une PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ADNc d'intérêt. Les fragments PCR obtenus sont ensuite visualisés sur gel d'électrophorèse. Les principales difficultés de la technique sont :

La sensibilité des ARN à la dégradation de par l'omniprésence des RNases, notamment sur les mains des manipulateurs.

La contamination de la préparation d'ARN par de l'ADN génomique, on travaille alors à partir d'ARN polyadénylés purifiés ou bien, on traite les échantillons d'ARN par une désoxynucléase dépourvue de ribonucléase (dite rnase-free).




6. Matériels nécessaires

Banc UV (**A manipuler derrière un écran, ne pas exposer les yeux ou la peau, risque de brûlure**)

Congélateur -20°C

Glace (machine à production de glace)

Petite centrifugeuse de paille (**Lire le mode d'emploi avant la première utilisation**)

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | FRANCHEL Jérôme | VENISSE Jean-Stéphane | JULIEN Jean-Louis |
| Fonction : | IE | MCF | PR, DU |
| Visa : |  |  |  |

| | | |
|---|--|--|
|  | Mode Opérateur RT-PCR Production d'ADNc | Réf. : MO-MET-007 Version : 1 Date : 06/09/2011 Page : 2/4 |
|---|--|--|

Thermocycleur ou blocs chauffants (**Ne pas toucher directement le bloc chaud !! Lire le mode d'emploi avant la première utilisation**)

Tubes PCR en plaque ou en barrette ou tube Eppendorf et bouchons correspondants
Vortex

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Attention au tampon utilisé il existe du tampon 10 X et 5 X au laboratoire !

SuperScript III (Invitrogen) :

- **Kit First-Strand (18080-051)** livrée avec **Tampon 10 X, MgCl₂ 25 mM**, Oligo(dT)20 (50 µM), Random hexamers (50 ng/µl), 0,1 M DTT, 10 mM dNTP mix, SuperScript III RT (200 U/µl), RNaseOUT (40 U/µl), RNase H (2 U/µl).
- **SuperScript III Reverse Transcriptase (18080-093, 18080-044 et 18080-085)** livrée avec SuperScript III RT (200 U/µl), **5X First-Strand Buffer (MgCl₂ 15 mM inclus)** et 0,1 M DTT.

Dans ce Mode Opérateur est décrit la procédure en utilisant le Tampon 10 X sans MgCl₂ avec ajout de MgCl₂ 25 mM.

Agarose

ARN totaux extraits (MO-MET-002)

dNTP 10mM

DTT 0,1 M

Eau stérile avec DEPC

MgCl₂ 25 mM

Oligo dT 50 µM

Orange G ou Bleu

RNase H 2 U/µl

RNaseOUT 40 U/µl

SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µL) et son Tampon 10 X

TAE 0,5 X

8. Contraintes de la méthode

Les ARN sont très fragiles !

Travailler avec des gants, dans la glace.

Allumer les thermocycleurs ou blocs chauffants quelques minutes avant leur utilisation.

9. Contenu du mode opératoire

Toutes les étapes doivent être réalisées avec des gants

1ère étape : Dénaturation des ARN en présence d'Oligo dT

Mélanger dans la glace (réaliser un mix avec les oligodT, dNTPs et eau) :

| | | | |
|--------------------|---------|-----|----|
| 1 µg* d'ARNtx | | 2 | µL |
| OligodT | (50 µM) | 0,5 | µL |
| dNTPs | (10 mM) | 1 | µL |
| eau RNase free qsp | 10 µL** | 6,5 | µL |

Programme Thermocycleur
65°C 5 minutes
4°C 2 minutes
4°C ∞

Incuber à 65°C – 5 min

Placer dans la glace

2ème étape : Reverse transcription

Rajouter dans chaque échantillon 10 µL du mix suivant :

| | | | |
|------------------------|------------|------|------|
| Tampon | <u>10X</u> | 2 | µL |
| RNase OUT | (40U/µL) | 0,5 | µL |
| MgCl ₂ | (25 mM) | 4 | µL |
| DTT | (0,1 M) | 2 | µL |
| eau RNase free qsp | 20 µl | 1,25 | µL |
| Super Script III RTase | (200U/µL) | 0,25 | µL * |

Programme Thermocycleur
50°C 1 heure
85°C 5 minutes
4°C ∞

Incuber à 50°C – 1 heure puis à 85°C – 5 min

Microcentrifuger légèrement

3ème étape : Elimination des structures double brin ARN-ADNc par traitement à la Rnase H

Ajouter 0,5 µL de RNase H (2U/µL)

Incuber à 37° C – 20 min

4ème étape : Vérification de la qualité des ADNc issus de la RT

Déposer sur gel d'agarose (1 %) 1 µL de solution d'ADNc (voir MO-MET-003)

Visualiser sous UV **avec gants et masque de protection**

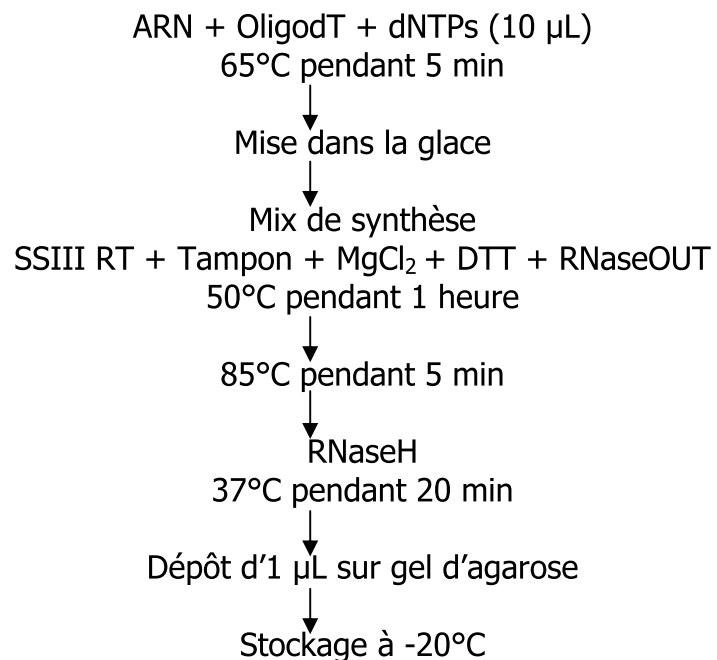
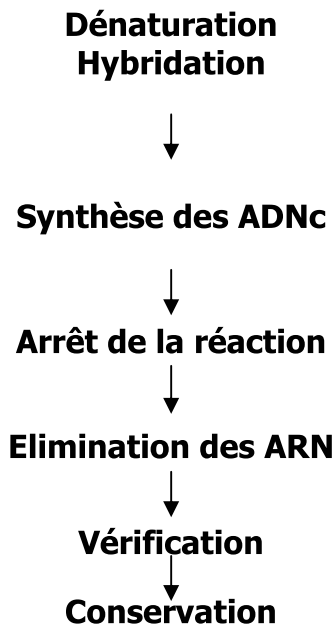
Aliquoter et stocker à -20°C****


* Dans le cas d'une étude ciblant des produits de gènes représentés en très faible quantité d'unité, ne pas hésiter à adapter d'une part la quantité d'ARNtx (pouvant aller jusqu'à 5 µg totale, mais nécessité de travailler avec des échantillons exempt d'impuretés, surtout si l'apport est réalisé au travers un volume important), et d'autre part avec 100 U d'enzyme.

** Ce volume ne doit pas excéder 13 µL

*** L'enzyme Super Script III RTase a été spécialement développée pour pouvoir lancer une RT durant une nuit sans qu'elle ne finisse par digérer ses substrats, mais surtout ses produits !!! Cette aptitude n'est surtout pas applicable à l'enzyme Super Script II RTase.

**** Le fait de congeler les produits cDNA avant toute utilisation en qPCR permet d'obtenir une meilleure reproductibilité de résultats d'amplification entre répliquats, et donc, lors de comparaison entre échantillons. Cette observation empirique n'a jamais reçu d'explication rationnelle.



| | | |
|---|---|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-008 |
| | Programmation du logiciel iQ5 pour lancer une expérience | Version : 1 Date : 06/09/2011 Page : 1/9 |

1. Objet et domaine d'application

Configuration du logiciel dans le but de réaliser une expérience de PCR Quantitative pour suivre l'évolution de l'expression d'un ou plusieurs gènes.

2. Documents de référence

iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System – Instruction Manual & Resource Guide, Biorad
iQ™5 Optical System Software – Instruction Manual, Biorad

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tout personnel voulant réaliser une PCR Quantitative

4. Hygiène et sécurité

L'appareil permet de chauffer les échantillons à plus de 90°C, il faut donc faire attention en l'ouvrant de ne pas toucher le couvercle ou le bloc chauffant. La plaque d'échantillon peut elle aussi être encore chaude. Il faut donc s'assurer de la température du matériel avant d'ouvrir le couvercle. Pour cela regarder la température affichée sur l'appareil.

5. Principe de la méthode

Pour réaliser une expérience de PCR quantitative, il faut programmer un protocole qui servira à piloter le thermocycleur, un plan de plaque qui servira à l'analyse ultérieure des données et une plaque contenant le mix réactionnel (voir MO-MET-009).

Le programme du thermocycleur définit les cycles de température (dés hybridation, hybridation avec les amorces, élongation) ainsi que l'acquisition des données de fluorescence. Une courbe de fusion peut également être ajoutée en fin d'expérience afin de déterminer la température d'hybridation des produits PCR générés. En fonction de la taille et de la composition en bases d'un fragment PCR une température d'hybridation spécifique sera obtenue, ceci permet de vérifier que le signal de fluorescence obtenu correspond bien à l'accumulation du produit PCR attendu.

Le plan de plaque sert à identifier chaque puits de la plaque en précisant le type et le nom de l'échantillon, le type de fluorophore, les répliquas... Ces informations seront très utiles lors de l'analyse de même si cette expérimentation doit être reprise ultérieurement.

6. Matériels nécessaires

Logiciel iQ5 (CD d'installation disponible auprès de Jérôme FRANCHEL bureau N123)

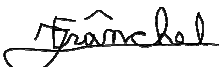


Le programme et plan de plaque peuvent être entrés sur un autre ordinateur équipé du logiciel puis être installés sur l'ordinateur pilotant l'appareil avec une clé USB.

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Non Pertinent

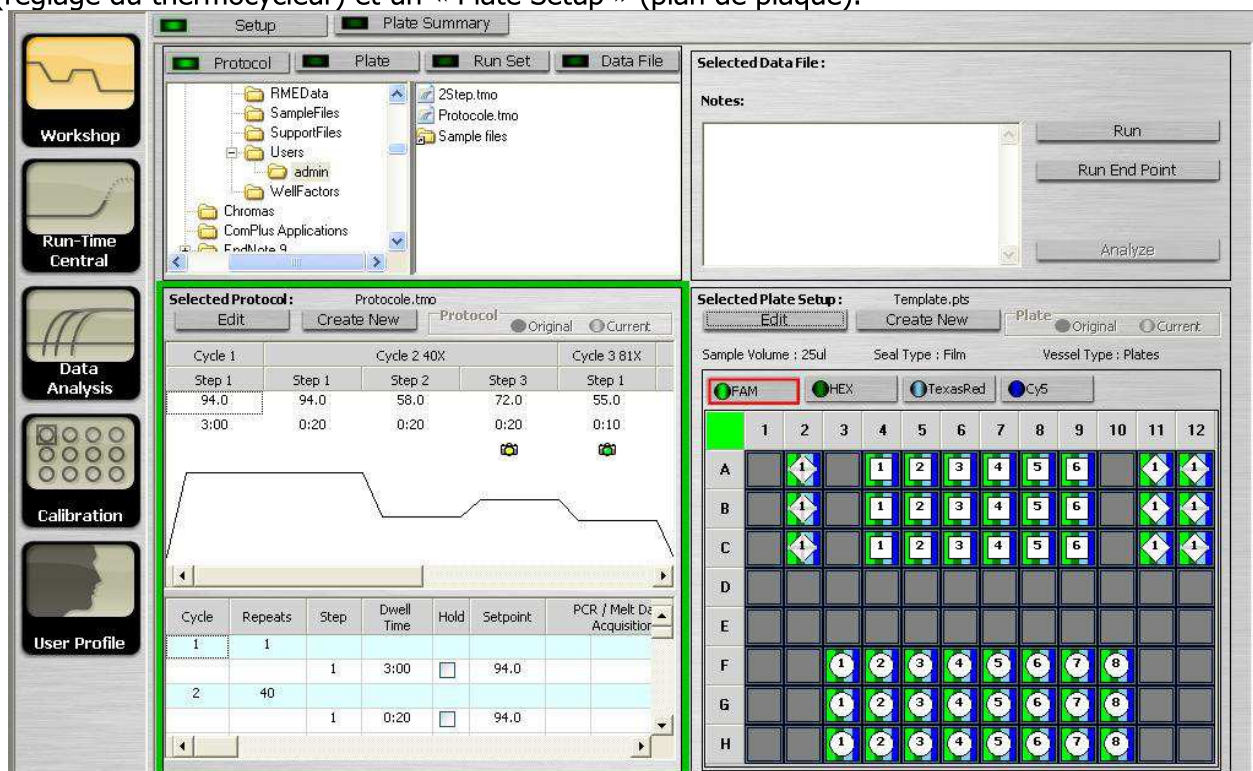
8. Contraintes de la méthode

Non Pertinent

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|--|---|
| Nom : | FRANCHEL Jérôme | GOURCILLEAU Delphine | FRANCHEL Jérôme |
| Fonction : | IE | Doctorante | IE |
| Visa : |  |  |  |

9. Contenu du mode opératoire

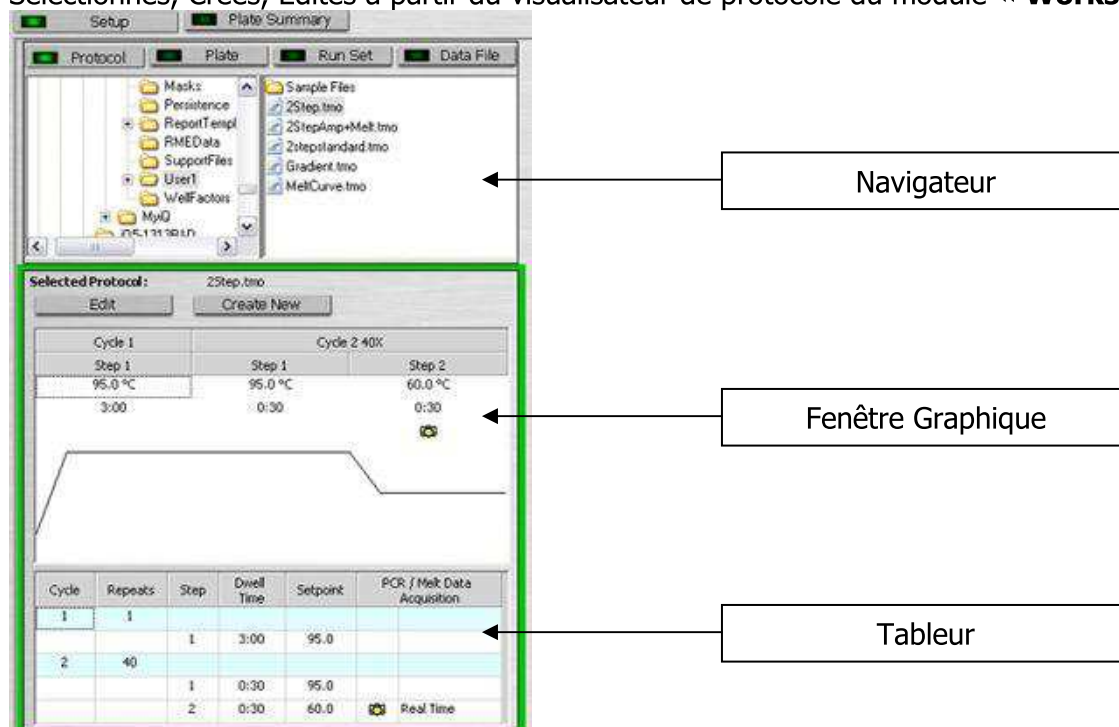
Pour commencer double cliquez sur l'icône iQ5 sur le bureau, choisir l'utilisateur 547 PIAF (mot de passe = piaf). Le programme s'ouvre dans le « Workshop » ou l'on doit définir un « Protocole » (réglage du thermocycleur) et un « Plate Setup » (plan de plaque).



a) Sélectionner, Editer ou créer un protocole

Les protocoles peuvent étre :

Sélectionnés, Créés, Edités à partir du visualisateur de protocole du module « **Workshop** »

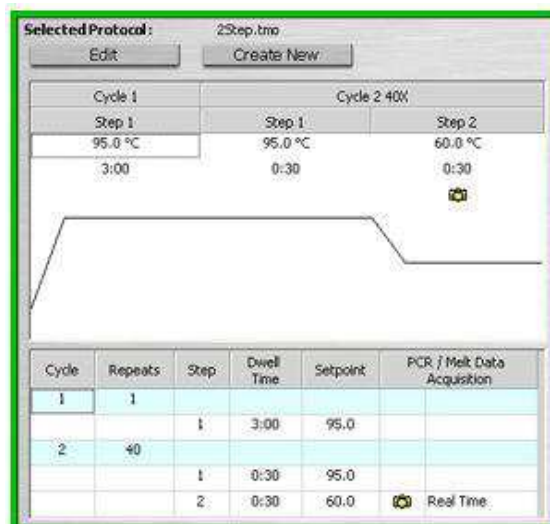


Le visualiseur est sélectionné en cliquant sur le bouton « Protocol »
Quand il est actif un cadre vert encadre la fenêtre graphique et le tableur. Le navigateur indique alors les fichiers de protocoles (suffixe *.tmo). Ces fichiers peuvent être sélectionnés et visualisés dans la fenêtre graphique et le tableur.

Sélection d'un Protocole

Pour sélectionner un protocole :

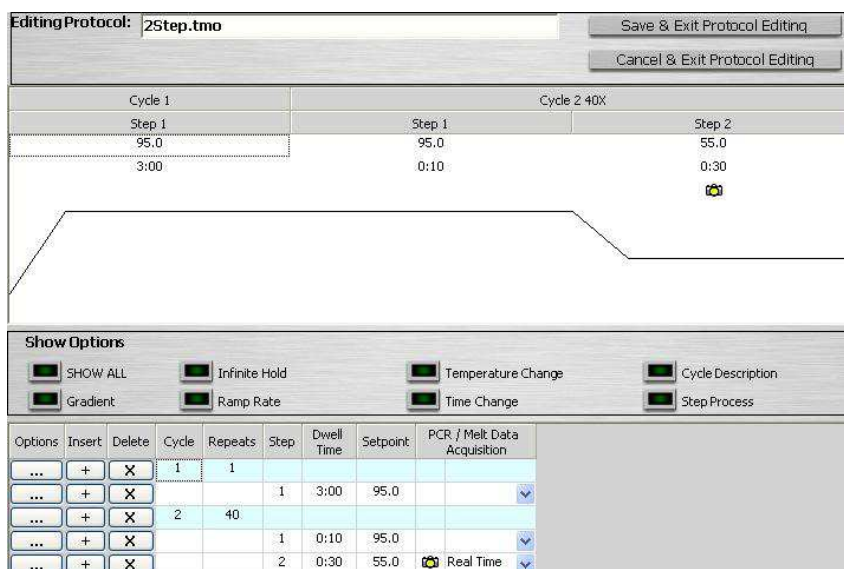
Localiser le dossier en utilisant le navigateur situé sous le bouton Protocol.
Cliquer sur le protocole, il apparaît alors dans la fenêtre « Selected Protocol »



Edition ou Création d'un protocole

Editer ou sélectionner un protocole en cliquant Edit dans la fenêtre « Selected Protocol ».
Créer un protocole à partir d'un protocole trame en cliquant Create New dans la fenêtre « Selected Protocol ».

Ces actions conduisent à ouvrir la fenêtre d'édition du protocole :



Editer le protocole en réalisant une ou plusieurs des actions suivantes :

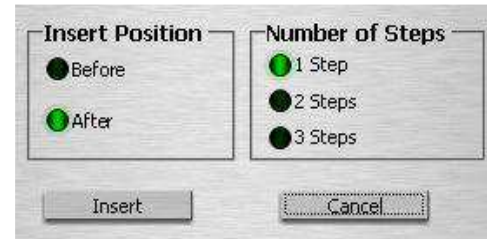
1. éditer le temps des étapes « Dwell Time » et la température « Setpoint »
Cliquer sur la cellule correspondante et entrer la valeur voulue. Pour entrer 10 secondes, taper 0 suivi de : ou . et 10
2. Acquisition des données
Dans la colonne « PCR/Melt Data Acquisition », cliquer sur la cellule correspondante à l'étape où vous voulez acquérir les données puis choisissez entre « Real-Time » pour collecter des données en temps réel ou « Melt Curve » pour des données de courbe de fusion.
Note: vérifier que le protocole a bien au moins une étape d'acquisition des données.

3. Insérer des cycles (Cycle) et des échelons (Step)

Insérer un cycle en cliquant sur le **+** dans la colonne « Insert » au niveau du numéro de cycle. Les cycles ont un fond bleu. Le logiciel iQ5 insère les nouveaux cycles en dessous du cycle concerné.

Insérer un échelon en cliquant sur le **+** dans la colonne « Insert » au niveau du numéro d'échelon. Les cycles ont un fond blanc. Le logiciel iQ5 insère les nouveaux échelons en dessous de l'échelon concerné.

Note: La colonne « Options » permet de définir la position de l'insertion en cliquant sur Avant (Before) ou après (After) ainsi que le nombre d'échelons à insérer.



4. Suppression de cycles et d'échelons

Supprimez un cycle ou un échelon en cliquant sur **X** dans la colonne « Delete »

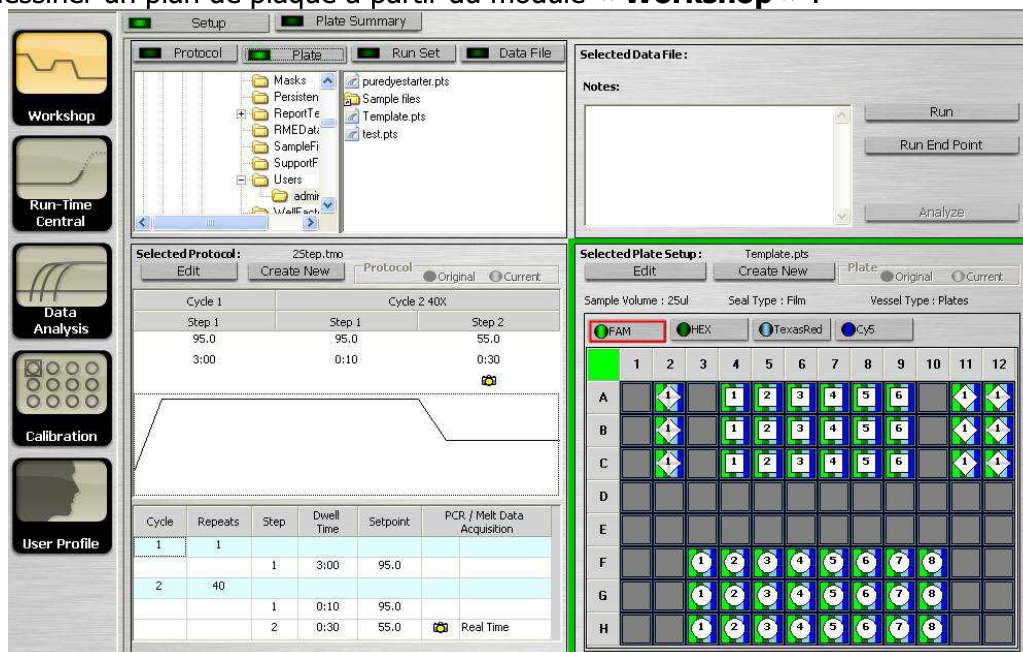
5. Sauvegarder un protocole

Cliquer sur « Save & Exit Protocol Editing ». Tapez le nom du protocole dans la boîte de dialogue « Save As » et cliquez sur « Save ».

Si vous ne voulez pas sauvegarder vos modifications cliquez sur « Cancel & Exit Protocol Editing ».

b) Sélectionner, Editer ou créer un plan de plaque

Pour dessiner un plan de plaque à partir du module « **Workshop** » :

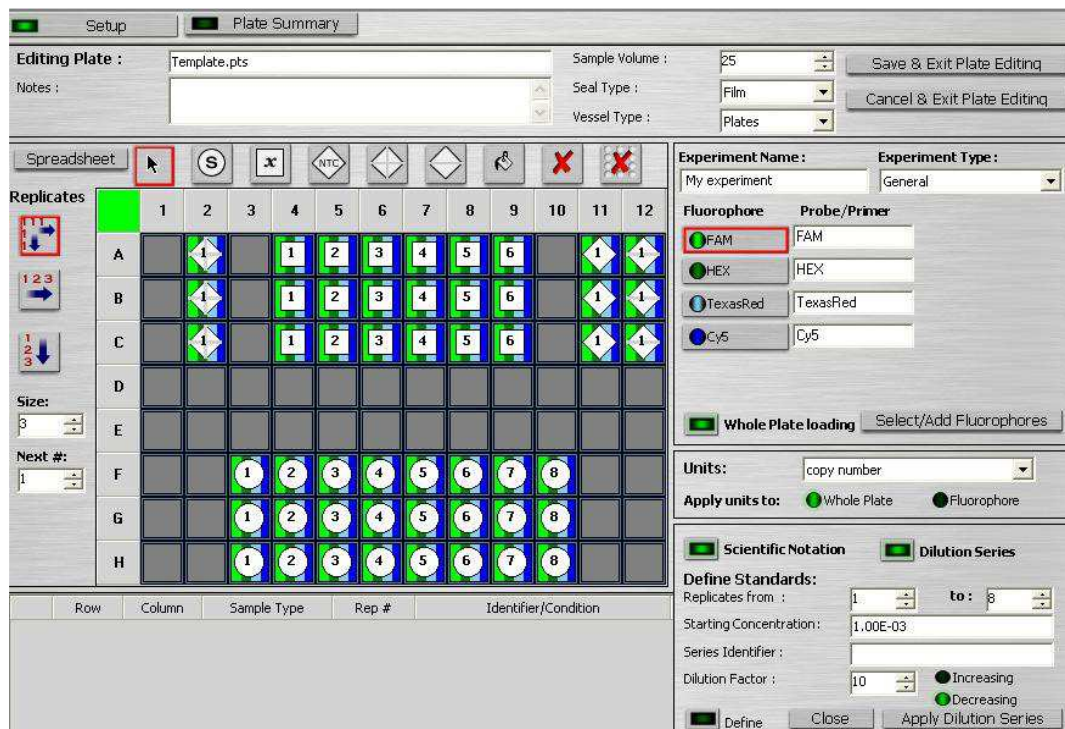


- Cliquer sur « Create New » dans la fenêtre de plan de plaque « Selected Plate Setup » pour entrer dans l'éditeur de plaque.

ou









- Cliquer sur « Plate ». Dans le navigateur, double cliquer sur le nom du fichier pour ouvrir le fichier désiré dans l'éditeur de plaque.

1. Saisir ou éditer toutes les remarques à propos du plan de plaque dans la boîte « Notes ».
2. Saisir ou éditer le volume réactionnel, le type de scellage ainsi que le type de plaque.
3. Saisir ou éditer le nom de l'expérience.
4. Cliquer sur « Select/Add Fluorophores » et choisir les fluorophores utilisés. Associer chaque fluorophore à une couleur unique.



5. Cliquer sur l'icône du type d'échantillon



-  **Standard** : définit un standard
-  **Unknowns** : échantillon test
-  **No Template Controls** : témoins eau, sans ADNc
-  **Positive Controls** : témoins positifs
-  **Negative Controls** : témoins négatifs
-  **Fluorophore loading in whole plate mode** : quand actif, permet en sélectionnant un puits d'un groupe de répliquât d'affecter le fluorophore choisi
-  **Erase well(s) by selected fluorophores** : quand actif, permet en sélectionnant un puits d'un groupe de répliquât d'éliminer le fluorophore choisi
-  **Erase well(s)** : quand actif, permet en sélectionnant un puits d'éliminer toutes les informations de ce puits sans affecter les autres puits du groupe de répliquât

6. Sélectionner le type de réplicat (en ligne/en colonne, par 2-3-4-...)
7. Cliquer sur un fluorophore
Attention l'appareil iQ5 ne peut être utilisé qu'avec le filtre 2, c'est-à-dire avec les fluorophores FAM ou SybrGreen. Par contre plusieurs SybrGreen peuvent être notés sur un plan de plaque par exemple en cas d'utilisation de plusieurs couples d'amorces sur une plaque. Il est également possible de rajouter des noms de fluorophores à la liste proposée.
8. Cliquer et glisser sur la plaque pour définir les puits avec le fluorophore et le type d'échantillon sélectionné
9. Poursuivre avec les autres types d'échantillons ou de fluorophores
10. Pour effacer un puits mal annoté, cliquer sur l'icône « Erase well(s) » puis cliquer sur le puits
11. Pour effacer le fluorophore affecté à un puits, cliquer sur « Erase well(s) by selected fluorophores » (croix rouge) puis sur le puits
12. Si il y a des standards, cliquez sur « Dilution Series » et calculez les concentrations en appliquant un facteur de dilution ou tapez les directement dans le tableur manuellement
13. Cliquez sur « Save & Exit Plate Setup » et donnez un nom au plan de plaque. Si vous ne voulez pas sauvegarder vos modifications cliquez sur « Cancel & Exit Plate Setup ».

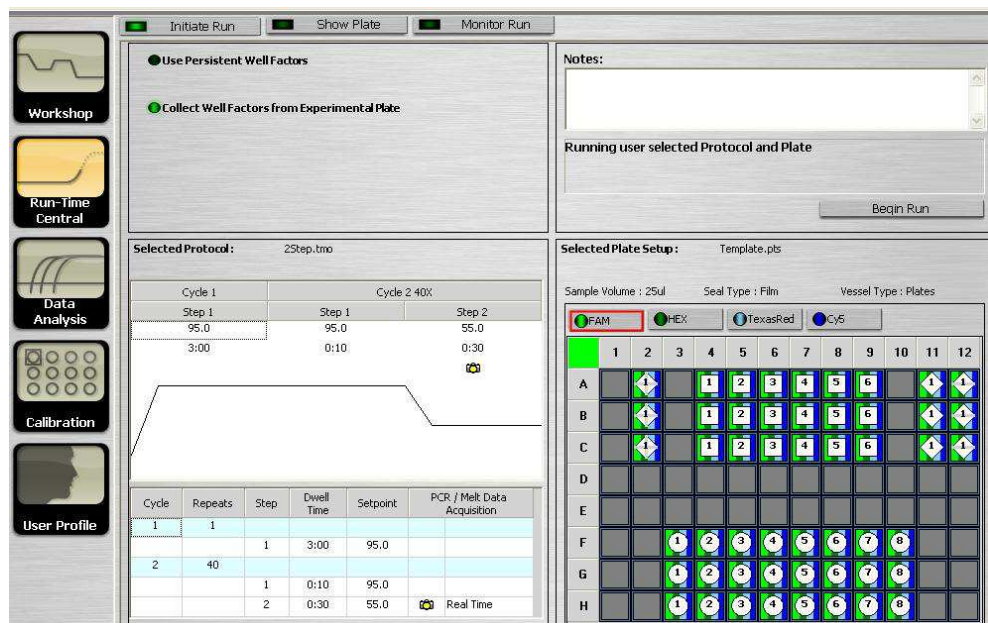
c) Lancer l'expérience



Cliquez sur « Run » pour démarrer l'expérience

d) Exécuter le protocole et le plan de plaque sélectionné

Après avoir cliqué sur « Run » dans le module « **Workshop** », le logiciel iQ5 ouvre la table « **Initiate Run** » dans le module « **Run-Time Central** ».



| Cycle 1 | | Cycle 2 40x | | |
|---------|--------|-------------|--------|--------|
| Step 1 | Step 1 | Step 1 | Step 2 | Step 2 |
| 95.0 | 95.0 | 95.0 | 55.0 | 55.0 |
| 3:00 | 0:10 | 0:30 | | |

| Cycle | Repeats | Step | Dwell Time | Setpoint | PCR / Melt Data Acquisition |
|-------|---------|------|------------|----------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 3:00 | 95.0 | |
| 2 | 40 | 1 | 0:10 | 95.0 | |
| | | 2 | 0:30 | 55.0 | Real Time |

Pour commencer une expérience :

Vérifiez que le protocole et le plan de plaque désiré apparaissent dans la partie basse de la fenêtre.

Sélectionnez « Collect Well Factors from Experimental Plate » dans le cadre en haut à gauche.

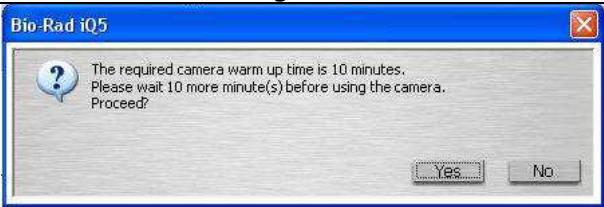
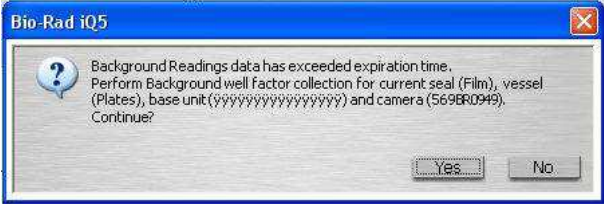
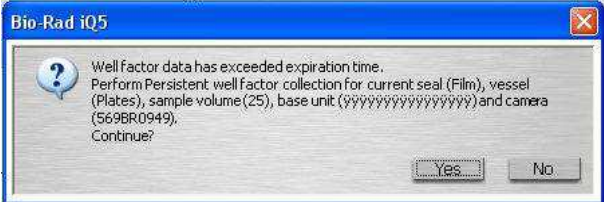
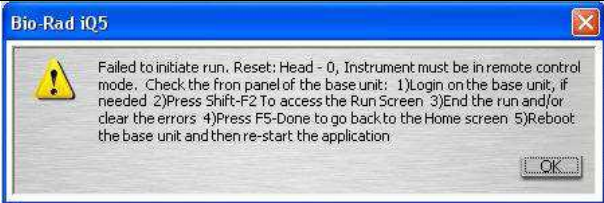
Cliquez sur « Begin Run ».

Nommez le fichier et sauvez-le dans votre dossier. Lors de la première expérience et pour plus de lisibilité dans le dossier « 547 PIAF » il est utile de vous créer un sous dossier à votre nom pour enregistrer vos expériences.

Cliquez sur OK

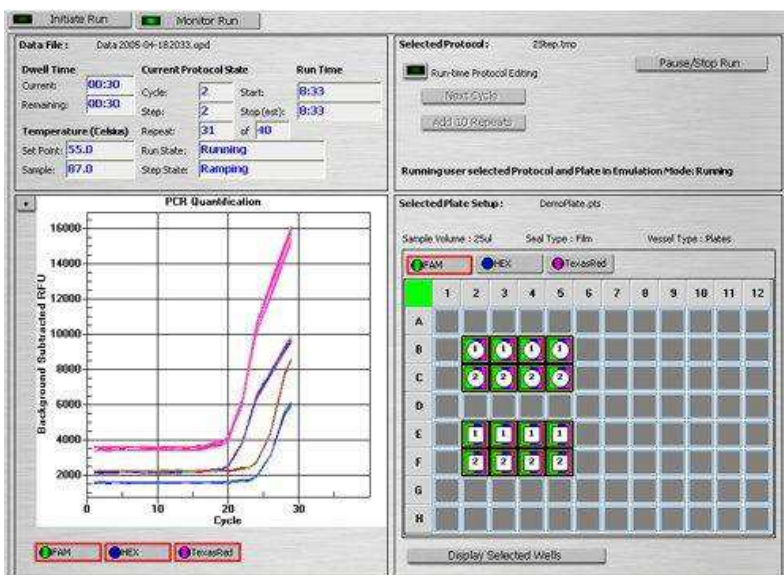
e) Messages d'erreurs pouvant apparaître

Différents types de messages d'erreurs peuvent apparaître au moment de lancer l'expérience :

| Message d'erreur | Raison | Solution |
|---|--|--|
|  | Le temps de chauffe de la lampe est insuffisant. | Laisser 10 minutes de chauffe supplémentaire et cliquer No ou si le temps est inférieur à 5 min cliquer Yes et la lampe finira de chauffer pendant l'étape de dénaturation initiale. |
|  | La date de la dernière calibration du bruit de fond est supérieure à 1 mois. | Cliquer Yes et le signaler à Jérôme Franchel (55.26). |
|  | La date de la dernière calibration des Well Factor est supérieure à 1 mois. | Cliquer Yes et le signaler à Jérôme Franchel (55.26). |
|  | Le programme précédent n'a pas été stoppé de manière régulière. | Suivre les indications données : 1-Se connecter sur la base du thermocycleur 2-appuyez sur Shift-F2 pour accéder à l'écran de Run 3-Stoppez le programme et/ou effacez les erreurs 4-Appuyez sur F5-Done pour retourner à l'écran d'accueil 5-Redémarrer la base du thermocycleur et relancer le logiciel iQ5 |

f) Edition du protocole en cours d'expérience :

Quand le système démarre l'expérience, le logiciel ouvre la table « Monitor Run ». Vous pouvez alors suivre l'avancée de l'expérience en temps réel sur la fenêtre.



La partie gauche présente un suivi en direct de la fluorescence en fonction des cycles ainsi qu'un positionnement dans le cycle. Il est également affiché l'heure prévue de fin du programme. La partie droite représente le plan de la plaque ainsi que quelques fonctions utilisables en cours de programme.

Deux choix d'édition sont disponibles pendant une expérience : passage au cycle suivant « Next Cycle » et ajout de 10 répétitions « Add 10 Repeats ». Pour accéder à ces options il faut activer la case « Run-time Protocol Editing »



Le bouton « Next Cycle »

En cliquant sur ce bouton la répétition actuelle se termine et l'appareil passe au cycle suivant, cette option peut être utilisée pour passer à la courbe de fusion lorsque tous les échantillons ont passés le seuil.

Le bouton « Add 10 Repeats »

En cliquant sur ce bouton 10 répétitions sont ajoutées au cycle en cours. Cette options peut être utilisée de multiples fois (le nombre maximum de répétitions est de 600) et ce jusqu'à ce que le signal de fluorescence dépasse le seuil par exemple.

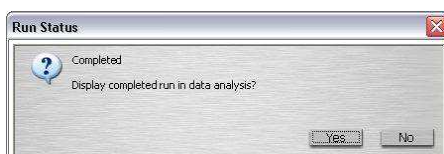
Le bouton Pause/Stop Run


Ce bouton permet de faire une pause dans le programme en arrêtant le décompte du temps à la température à laquelle la pause à lieu. Si la pause à lieu durant un changement de température la montée ou descente continue jusqu'à atteindre la température désirée.

Une fois ce bouton activé deux nouveaux boutons apparaissent « Resume Run » pour reprendre le programme et « End Run » pour arrêter le programme.

g) Fin de l'expérience

A la fin du programme la boîte de dialogue « Run Status » apparait.



| | | |
|---|--|---|
|  | Mode Opérateur Programmation du logiciel iQ5 pour lancer une expérience | Réf. : MO-MET-008 Version : 1 Date : 06/09/2011 Page : 9/9 |
|---|--|---|


Vous pouvez alors choisir de procéder à l'analyse en passant dans le module « Data Analysis » ou de retourner au « Workshop » pour lancer une nouvelle expérience.

Lorsque votre programme est terminé et si aucun autre utilisateur n'est noté dans le créneau suivant, veuillez à éteindre le module optique et le thermocycleur.

Il est possible de récupérer le fichier de l'expérience (fichier *.opd) pour réaliser l'analyse sur un autre poste. Pour cela double cliquez sur l'icône « Raccourci vers Users » puis sélectionnez le dossier « 547 PIAF » et enfin le sous dossier à votre nom. Le fichier *.opd peut alors être copié sur une clef USB.

Remarque :

Les informations données ici, sont également disponibles en anglais à partir du logiciel iQ5 en cliquant sur le menu Help puis sur Online Help et en choisissant Quick Guides.

| | | |
|---|---|---|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-009 |
| | PCR Quantitative relative avec SybrGreen | Version : 2 Date : 06/09/2011 Page : 1/8 |

1. Objet et domaine d'application

Analyse de l'expression d'un gène au cours d'une cinétique...

2. Documents de référence

Pfaffl M.W. (2001) : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res., 29 :e45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004) : Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett. Mar;26(6):509-15.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) : Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. Jun 18;3(7)

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. (2004) : Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biol. Aug 18;4:14.

Wong M. L., Medrano J. F. (2005) : Real-time PCR for mRNA quantification. BioTechniques, 39:75-85.

iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System – Instruction Manual & Resource Guide, Biorad
iQ™5 Optical System Software – Instruction Manual, Biorad

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tout personnel voulant réaliser une PCR Quantitative

4. Hygiène et sécurité

SybrGreen, extrait de la « Fiche de Données de Sécurité » :

- Ce produit est classé non dangereux.
- Attention: La substance n'a pas encore été complètement testée.

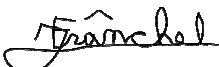


A manipuler avec des gants et à protéger de la lumière.

De plus il est dissous dans le DMSO

Instructions pour une manipulation en toute sécurité : Ne pas respirer les vapeurs. Eviter tout contact avec des solutions de DMSO contenant des produits toxiques ou des produits dont la toxicité est inconnue. Le diméthyl sulfoxyde, dont l'absorption cutanée est facile, peut permettre à de tels produits de pénétrer dans le corps. Éviter toute exposition prolongée ou répétée.

5. Principe de la méthode

Le principe de la « PCR en temps réel » consiste à obtenir des courbes d'amplification par la détection de fluorescence en temps réel. On utilise pour cela un thermocycleur associé à un dispositif permettant d'émettre une énergie lumineuse de longueur d'onde définie et d'un dispositif de lecture de fluorescence émanant des tubes. Ainsi au cours de la PCR les données concernant la

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | FRANCHEL Jérôme | GOURCILLEAU Delphine | JULIEN Jean-Louis |
| Fonction : | IE | Doctorante | PR, DU |
| Visa : |  |  |  |

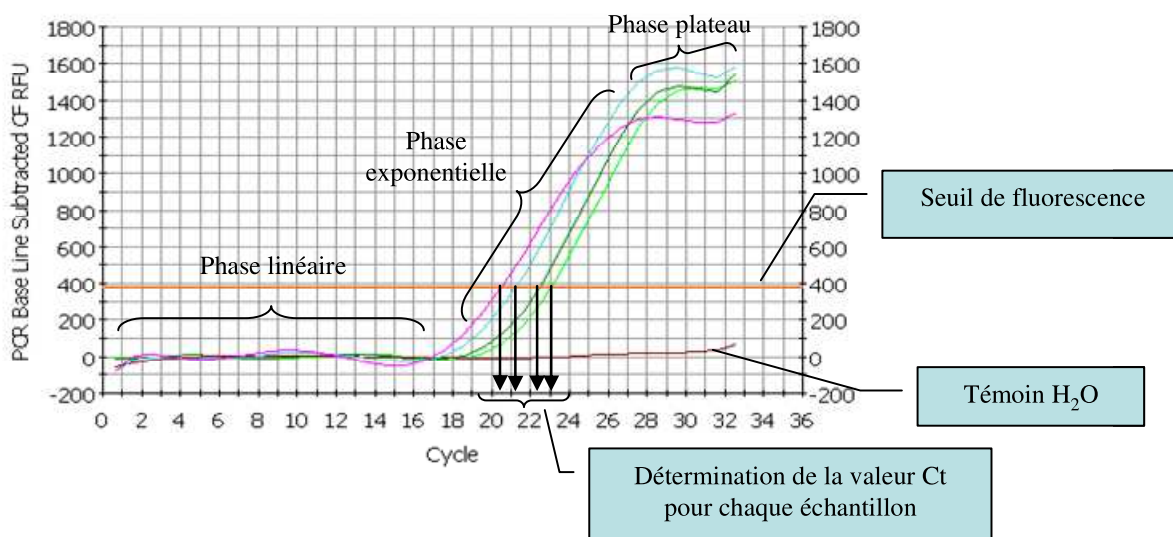
quantité de produit amplifié sont enregistrées « en temps réel ». La quantification repose sur la phase exponentielle et exploite un nouveau paramètre : le Ct (Threshold Cycle ou cycle seuil)

La valeur Ct :

La quantité obtenue à la fin d'une PCR n'est pas toujours significative, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales. C'est le moment où le signal sort du bruit de fond (seuil de fluorescence défini suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond) qui est significatif. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles et est appelé Ct.

Pour deux quantités initiales différentes on obtiendra deux valeurs de Ct différentes : si des dilutions successives sont effectuées on obtiendra des courbes d'amplifications décalées vers la droite dont les Ct sont successivement augmentés d'une valeur constante.

La valeur Ct est représentative du nombre de copie initial du gène d'intérêt dans l'échantillon analysé et sera donc utilisée pour l'analyse des résultats via des calculs.



Utilisation du SybrGreen :

Le SybrGreen est un colorant qui comme le bromure d'éthidium s'intercale au niveau des chaînes double brin de l'ADN et ne devient fluorescent que s'il se lie à une molécule double brin. Compatible avec la PCR, ajouté à faible dose dans le mélange réactionnel, le SybrGreen permet donc de suivre l'augmentation des produits d'amplification en mesurant la fluorescence dans sa gamme d'émission en fin d'élongation. L'intérêt du SybrGreen est qu'il n'est nul besoin de concevoir une sonde spécifique au gène d'intérêt (ex : chimie TaqMan®). En contrepartie, la fluorescence mesurée peut provenir de produit d'amplification non spécifique : il faut donc s'assurer de la spécificité des produits PCR (dépôt sur gel) et de l'absence de dimères d'amorces (analyse de la Melt Curve ou courbe de fusion).

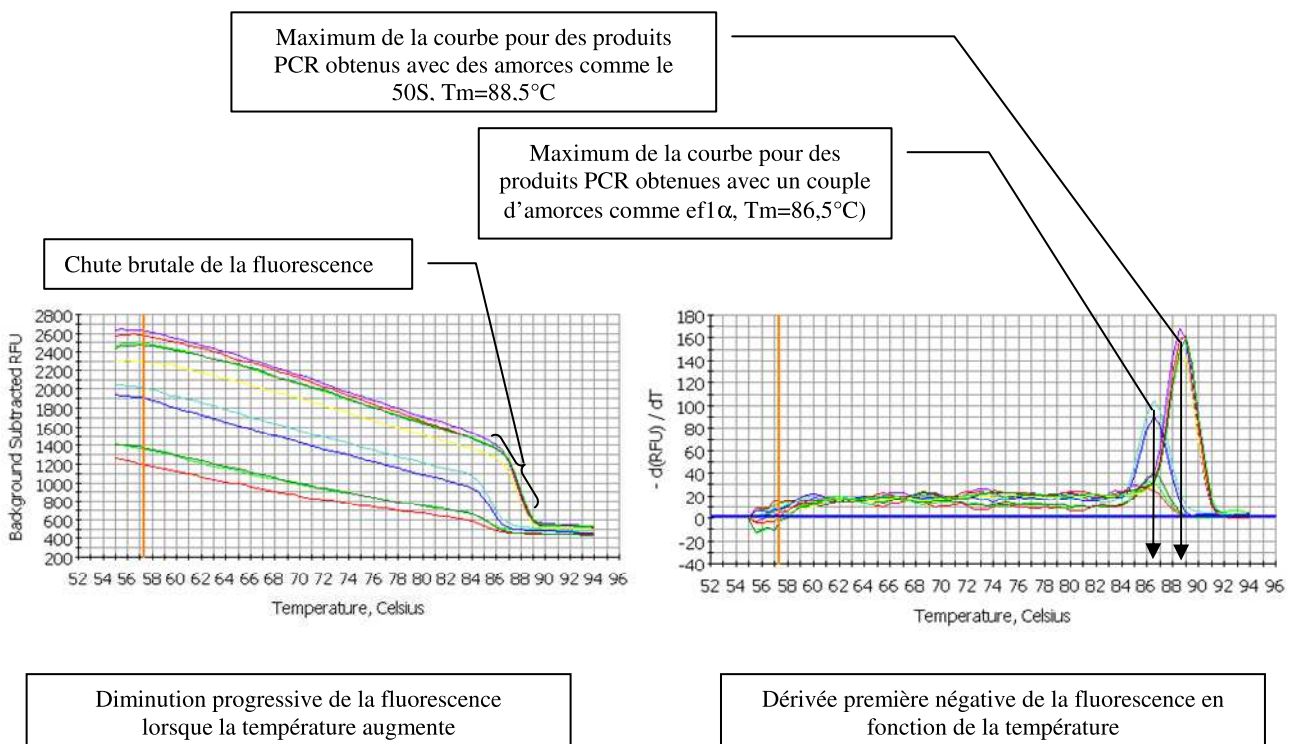
Quantification relative et gène de référence :

La PCR quantitative consiste à comparer au moins deux échantillons. Un échantillon sert de référence et la quantification des autres est faite relativement à cette référence. Si le nombre de molécule de la référence est connue alors une quantité absolue peut être assignée à chaque échantillon (en nombre de molécules ou de copies). Lorsque le nombre de molécules n'est pas connu on parle de quantité relative : on détermine alors l'expression relative du gène cible par comparaison à un gène de référence ou contrôle endogène (ex : facteur d'élongation ef1 α , 50S...).

Le contrôle endogène est un gène non-régulé, dont l'expression est stable quelque soit le traitement expérimental exercé sur le matériel végétal (ou animal...). Il va donc donner une image de la quantité de matrice ADNc apportée et normaliser les biais d'extraction et les variations d'efficacité de transcription inverse. Le choix de ce contrôle est un point critique de la quantification relative (Vandesompele et al., 2002 ; Pfaffl et al., 2004 et Brunner et al., 2004).

la Melt Curve ou Courbe de Fusion :

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique (T_m) définie comme étant la température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin puis abaissée à la température de couplage (ex : 55°C) ce qui provoque la reformation des structures double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée. Sachant que le SybrGreen est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin, quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie et la fluorescence diminue progressivement. Lorsque 50% de l'ADN est sous forme simple brin, la fluorescence chute brutalement : c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe. Plus la valeur T_m est élevée plus le produit d'amplification est spécifique. L'observation d'un seul pic pour un couple d'amorces est équivalent à dire qu'il y a un unique produit d'amplification et pas de dimères d'amorces.



6. Matériels nécessaires

Plaque PCR et Film (ABgene)

Thermocycleur équipé temps réel iQ ou MyiQ (MAT-PCR-004)

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

ADNc (MO-MET-003)

Amorces gènes spécifiques définies pour amplifier dans le 3'UTR entre 50 et 200 pb
MESA GREEN qPCR MAsterMix Plus for SYBR[®] Assay w/ fluorescein (Eurogentec)

| Produits Chimiques | Numéro CAS | CMR, OHB et autres dangers | | | Recommandations : conditions de stockage, d'utilisation, d'élimination... |
|-------------------------|-------------|----------------------------|---|------------|---|
| SYBR green I | 163795-75-3 | | 2 | C G | Stockage à -20°C à l'abri de la lumière Port de gants |
| DMSO, diméthylsulfoxyde | 67-68-5 | | 2 | SK C ST | Manipulation sous sorbonne Port de gants et écran ou protection oculaire |

Indications :

OHB : de 1 (faible) à 6 (élevée)

SK ou C : port de protection cutanée et oculaire indispensable

G : manipulation déconseillée pendant la grossesse

A : manipulation déconseillée en cas d'allaitement maternel

Pondération de la durée d'exposition : **ST** impossible, **SD** limitée

8. Contraintes de la méthode

- Réserver la PCR quantitative la semaine précédente
- Limiter l'exposition à la lumière des fluorochromes
- Ne pas contaminer la plaque ou le bloc PCR avec des éléments fluorescents (traces de doigts, peluches de papier, poussière...)
- Préchauffer la lampe du module optique 10 min avant le début de l'expérience

9. Contenu du mode opératoire

Pour l'analyse des résultats les points de mesure doivent être faits en triplicatas.

a) Préparation du programme de lancement de l'amplification :

Logiciel iQ5, Biorad : voir MO-MET-008

Pour éviter d'exposer les fluorochromes à la lumière il est préférable de préparer le protocole et le plan de plaque à l'avance.

Définition du « Protocol »

Dans le navigateur choisir dans le dossier Sample, le fichier : 2StepAmp+Melt.tmo

Modifier les étapes de manière à avoir :

| Cycle | Repeats | Step | Dwell Time | Setpoint | Data Acquisition | T° Change | End T° |
|-------|---------|------|------------|----------|------------------|-----------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 5.00 | 95.0 | | | |
| 2 | 40 | 1 | 0.15 | 95.0 | | | |
| | | 2 | 0.20 | 60.0 | Real Time | | |
| | | 3 | 0.20 | 72.0 | | | |
| 3 | 81 | 1 | 0.10 | 55.0 | Melt Curve | 0.5 | 95.0 |

Pour le Step 2 du Cycle 2 il faut entrer dans la colonne Setpoint (60.0), la valeur du Tm du couple d'amorce.

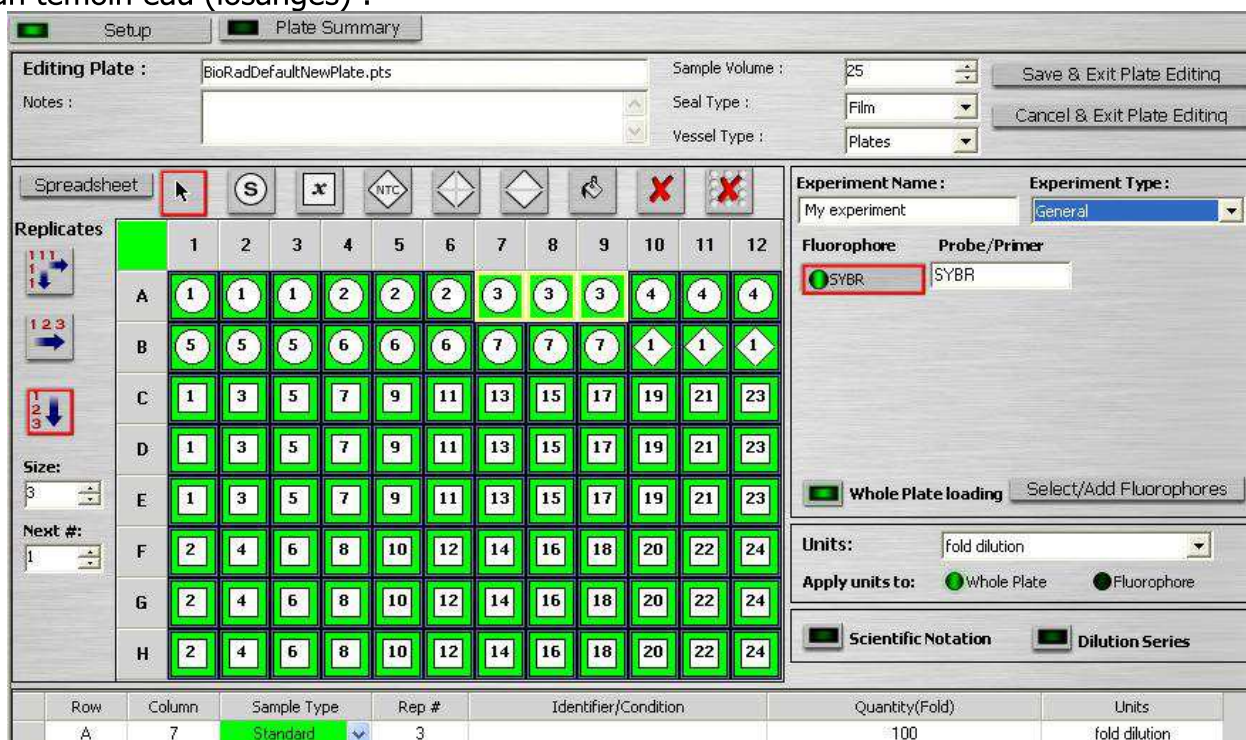
Il faut valider cette température en faisant un test en mode gradient avant de lancer l'expérimentation.

Sauvegarder le protocole en renommant et en enregistrant le fichier dans son dossier.

Dessin du plan de plaque « plate setup »

Sélectionner SYBR comme fluorophore et entrer l'emplacement des échantillons.

Exemple avec une gamme de dilution au dixième (ronds), 24 échantillons tests (carrés) et un témoin eau (losanges) :



The screenshot shows the 'Plate Setup' window with the following details:

- Editing Plate:** BioRadDefaultNewPlate.pts
- Sample Volume:** 25
- Seal Type:** Film
- Vessel Type:** Plates
- Experiment Name:** My experiment
- Experiment Type:** General
- Fluorophore:** SYBR
- Probe/Primer:** SYBR
- Units:** Fold dilution
- Apply units to:** Whole Plate (selected)
- Scientific Notation:** (checked)
- Dilution Series:** (checked)

The plate layout (rows A-H, columns 1-12) is as follows:

| Row | Column | Sample Type | Rep # | Identifier/Condition | Quantity(Fold) | Units |
|-----|--------|-------------|-------|----------------------|----------------|---------------|
| A | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| A | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| B | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| C | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| D | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| E | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| F | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| G | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 1 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 2 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 3 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 4 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 5 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 6 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 7 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 8 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 9 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 10 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 11 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |
| H | 12 | Standard | 3 | | 100 | fold dilution |

Renseigner également le volume réactionnel : 25 µL

Sauvegarder le plan de plaque en renommant et en enregistrant le fichier dans son dossier.

b) Préparation des échantillons ADNc :

Diluer au 40^{ème} un volume de Reverse Transcription. Cette valeur de dilution peut être adaptée en fonction de la richesse en ADNc d'intérêt.

Déposer dans une plaque PCR ABgene 2 µL de cette dilution.

Remarques

- la quantité d'ADNc à amplifier dépend des conditions PCR et des gènes étudiés : pour la mise au point de la technique il est nécessaire de faire différents essais pour déterminer le volume idéal de solution (sachant que plus le volume est petit plus on a de matériel pour les analyses).

- pour la mesure de l'efficacité de la PCR, on utilise une gamme d'ADNc. Il est impératif de réaliser cette mesure avant toute expérimentation pour les différents gènes testés. Cette gamme permet de définir l'efficacité de l'amplification pour le couple d'amorce.

c) Préparation du mélange réactionnel pour l'amplification PCR :

Préparer le mélange PCR dans la glace de la manière suivante :

(Données pour une réaction, soit un échantillon)

| | Concentration | Volume (µL) | Concentration finale |
|------|---------------|-------------|----------------------|
| ADNc | dil 1/40 | 2 | |

| | | | |
|-----------|--------|------|--------|
| Eau | qsp 25 | 9,5 | |
| MasterMix | 2 X | 12,5 | 1 X |
| AmorceFor | 10 µM | 0,5 | 200 nM |
| AmorceRev | 10 µM | 0,5 | 200 nM |



Vortexer quelques secondes le mélange et centrifuger brièvement (pulse)



Ajouter 23 µL de ce mélange aux échantillons d'ADNc (volume final = 25 µL) dans la plaque hors de la glace



Sceller la plaque avec le film adhésif et s'assurer du scellé
(Une évaporation du mélange peut contaminer tout l'appareil)

La concentration d'ADNc et d'amorces peut être ajustée en fonction des résultats.

La concentration en MgCl₂ de 4 mM final avec le MasterMix peut être augmentée. Pour cela rajouter de la solution de MgCl₂ à 50 mM fournie et ajuster le volume d'eau.

| Final MgCl ₂ concentration [mM] | MgCl ₂ à ajouter (µL / 25 µL) | 2 X MasterMix (µL) |
|--|--|--------------------|
| 4 | 0 | 12,5 |
| 4,5 | 0,25 | 12,5 |
| 5 | 0,5 | 12,5 |
| 5,5 | 0,75 | 12,5 |
| 6 | 1 | 12,5 |

f) Lancement du programme d'amplification

Allumer l'ordinateur, la lampe émettrice de fluorescence et le thermocycleur. Il est conseillé de laisser la lampe chauffer 10 minutes avant le lancement de l'expérience.

Placer la plaque dans le thermocycleur (elle est ainsi à l'abri de la lumière) en faisant attention au sens d'insertion par rapport au plan de plaque spécifié.

Ouvrir le logiciel « iQ5 ».

Choisir le protocole dans la banque de donnée (mettre en surbrillance) puis le plan de la plaque. Vérifier qu'apparaissent sur cette fiche le nom du protocole associé à la plaque d'échantillon et cliquer sur « Run ».

Apparaît alors la nouvelle fenêtre « Run-Time Central ». Sélectionner l'option « Collect Well factors from experimental plate », vérifier le volume réactionnel. Revérifier que le bon protocole et bien associé à la bonne plaque d'échantillons.

Cliquer sur « Begin Run » et indiquer le dossier dans lequel le fichier résultats (*.opd) doit être enregistré.

On peut alors suivre en temps réel le programme et les courbes d'amplification pour chaque échantillon.

Expression des résultats : calculs et interprétation

a) Vérification de la spécificité de la PCR

1^{ère} méthode : Analyse de la Melt Curve. L'observation d'un seul pic pour un couple d'amorces est équivalente à dire qu'il y a un unique produit d'amplification et pas de dimères d'amorces.

2^{ème} méthode : Préparer un gel d'agarose selon pour visualiser les produits d'amplification et vérifier l'obtention d'un fragment de taille attendue, l'absence de dimères...

Il est préférable lors des essais préliminaires de réaliser les 2 méthodes.

b) Calcul de l'efficacité de l'amplification (E)

Théoriquement, en phase exponentielle la quantité de produits amplifiés double à chaque cycle : E = 1,0 ou 100 %. Dans la réalité cette valeur doit être corrigée. La valeur E est calculée en phase exponentielle selon l'équation suivante :

$$E = 10^{[-1/\text{slope}] - 1}$$

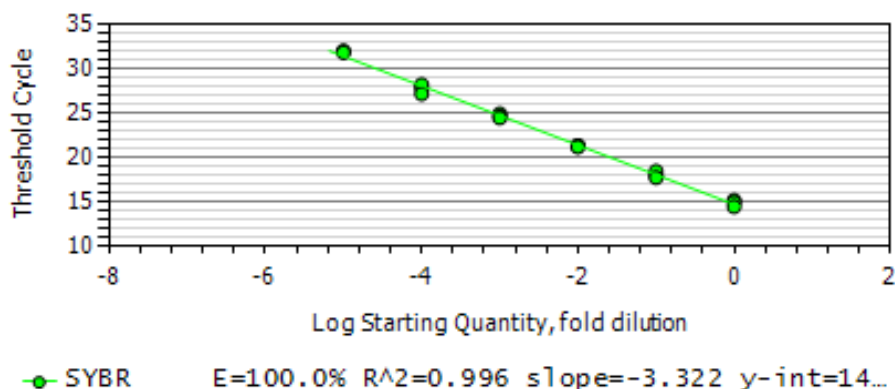
Ou « slope » correspond à la pente (valeur a) de la courbe de tendance « Valeur Ct en fonction de la quantité d'ADNc » dont l'équation est sous la forme $y=ax+b$ (rappel : pour deux quantités initiales différentes on obtient deux valeurs de Ct différentes ; si des dilutions successives sont effectuées on obtient des courbes d'amplification décalés successivement vers la droite dont les Ct sont successivement augmentés d'une valeur constante).

Avec un plan de plaque correctement renseigné (présence de standards), le logiciel calcule automatiquement la pente et l'efficacité de la réaction.

Critères de validité : $0,85 \leq E \leq 1,1$ $R^2 \geq 0,985$

Une efficacité supérieure à 1 peut être le signe d'une dimérisation ou d'une co-amplification.

Ex :



c) Quantification relative de l'expression du gène d'intérêt

L'expression relative (R ou ratio) d'un gène est calculé sur la base des valeurs E (efficacité PCR pour le gène cible et pour le gène de référence) et des variations des Ct (ΔCt) entre un échantillon et un témoin. L'expression relative est exprimée par comparaison à un gène de référence (gène dont l'expression est stable et non modifié par le traitement étudié).

$$R = \frac{(E \text{ cible} + 1)^{\Delta Ct \text{ cible (témoin - échantillon)}}}{(E \text{ réf} + 1)^{\Delta Ct \text{ réf (témoin - échantillon)}}$$


Une représentation graphique (histogramme) permet de mieux visualiser les modifications de l'expression du gène cible au cours du traitement.

Un nouveau Mode Opérateur (MO-MET-010) décrivant l'analyse des résultats doit être rédigée.

Information prix :

Prix valables (Prix indicatif 2009) en respectant les quantités du protocole =
Volume réactionnel de 25 μ l

| Produit | 1 puits | 1 plaque | |
|----------------|---------------|--------------|--------------------|
| MasterMix | 0,3103 | 31,03 | Prémix pour 100 |
| Amorces | 0,0008 | 0,08 | |
| Plaque PCR | 0,0250 | 2,40 | |
| Film | 0,0074 | 0,71 | |
| Total = | 0,3435 | 34,22 | € H.T. |

| | | |
|---|--|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-013 |
| | Multiplication <i>in vitro</i> de Peupliers | Version : 1 Date : 07/10/2011 Page : 1/5 |

1. Objet et domaine d'application

Multiplier des plants de peupliers (*Populus tremula x Populus alba*) issus d'*in vitro* par la technique de micropropagation (multiplication par bourgeonnement axillaire), afin d'obtenir des clones.

2. Documents de référence

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Toute personne voulant multiplier des Peupliers *in vitro* par micropropagation.

4. Hygiène et sécurité

Précautions à prendre lors de l'utilisation d'éthanol sous la hotte en présence de flamme (bec bunsen ou lampe à alcool).




5. Principe de la méthode

La multiplication végétative est un processus spécifique des plantes basé sur la totipotence cellulaire : " toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue".

Cette technique de micropropagation consiste à mettre en culture des bourgeons axillaires de peuplier sur un milieu défini (Murashige and Skoog), en conditions aseptiques, dans des tubes de verre (*in vitro*).

6. Matériels nécessaires

| | |
|---|--|
| Autoclave | <u>Matériel à stériliser</u> |
| Balance | (enveloppé dans du papier d'aluminium) |
| Bec bunsen ou lampe à alcool | Feuilles de papier filtre |
| Béchers et Erlenmeyers | Scalpel |
| Chambre climatique | Pinces (1 grande et 1 courbe) |
| Filtre 0,45 µm et seringue | |
| Hotte à flux laminaire | |
| pH-mètre | |
| Plaque chauffante et agitante | |
| Tubes de culture <i>in vitro</i> et portoir | |

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | BOISSELET Christelle | TIXIER Aude | FRANCHEL Jérôme |
| Fonction : | ADT | Doctorante | IE |
| Visa : |  |  |  |

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

| Produits chimiques | Numéro CAS | CMR, OHB et autres dangers | | Recommandations : conditions de stockage, d'utilisation, d'élimination... |
|---|------------|----------------------------|--------|---|
| Acide borique, H ₃ BO ₃ | 10043-35-3 | 3 | C G | Port de gants et protection oculaire |
| Acide nicotinique | 59-67-6 | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Agar (HP 696 KALYS) | 9002-18-0 | NP | | |
| Biotine | 58-85-5 | NP | SK | Port de gants et protection oculaire |
| Chlorure de calcium CaCl ₂ , 2H ₂ O | 10034-52-4 | 3 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Chlorure de cobalt CoCl ₂ , 6H ₂ O | 7646-79-9 | 4 | SK ST | Port de gants et protection oculaire |
| Dihydrogéo-phosphate de potassium, KH ₂ PO ₄ | 7778-77-0 | 1 | | Port de gants et protection oculaire |
| Ethanol, alcool éthylique FeNaEDTA | 64-17-5 | 1 | | |
| Iodure de potassium, KI | 7681-11-0 | 2 | G A ST | Port de gants et protection oculaire |
| L-Cystéine chlorhydrate | 52-90-4 | NP | | |
| L-Glutamine | 56-85-9 | NP | | |
| Molybdate de sodium Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 10210-40-6 | 2 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Myo-inositol | 87-89-8 | NP | C | Port de gants et protection oculaire |
| Nitrate d'ammonium NH ₄ NO ₃ | 6484-52-2 | 3 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Nitrate de potassium KNO ₃ | 7757-79-1 | 1 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Pantothénate de calcium | 137-08-6 | 1 | | Port de gants et protection oculaire |
| Pyridoxine hydrochloride | 65-23-6 | NP | | |
| Saccharose | 57-50-1 | | | |
| Sulfate de cuivre CuSO ₄ , 5H ₂ O | 7758-99-8 | 2 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Sulfate de magnésium MgSO ₄ , 7H ₂ O | 10034-99-8 | NP | | Port de gants et protection oculaire |
| Sulfate de manganèse MnSO ₄ , H ₂ O | 7785-87-7 | 2 | C ST | Port de gants et protection oculaire |
| Sulfate de zinc ZnSO ₄ , 7H ₂ O | 7733-02-0 | 3 | C | Port de gants et protection oculaire |
| Thiamine hydrochloride | 67-03-8 | NP | SK | Port de gants et protection oculaire |

Indications : **OHB** : de 1 (faible) à 6 (élevée)
SK ou C : port de protection cutanée et oculaire indispensable
G : manipulation déconseillée pendant la grossesse
A : manipulation déconseillée en cas d'allaitement maternel
Pondération de la durée d'exposition : **ST** impossible, **SD** limitée

8. Contraintes de la méthode

S'assurer de disposer du matériel stérilisé avant la manipulation.

Sortir les tubes de milieu à l'avance de la chambre froide pour qu'ils soient à température ambiante.

9. Contenu du mode opératoire

a) Préparation des solutions mères du milieu Murashige and Skoog (M&S)

Macro-éléments M&S (10X) : 1000 mL

- NH₄NO₃ 16,5 g
- KNO₃ 19 g
- CaCl₂, 2H₂O 4,4 g
- MgSO₄, 7H₂O 3,7 g
- KH₂PO₄ 1,7 g

Autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

Vitamines B (100X) : 500 mL

- Acide nicotinique 50 mg
- Pyridoxine hydrochloride 50 mg
- Thiamine hydrochloride 50 mg
- Pantothénate de calcium 50 mg
- L-cystéine chlorhydrate 50 mg
- Biotine* 5 mL

(* solution mère à [0,1 mg/mL] 5 mg / 50 mL dissoute dans du NaOH et conservée au frigo)

Stériliser par filtration (0,45 µm) et conserver à 4°C

Oligo-éléments (1000X) 100 mL

- H₃BO₃ 620 mg
- MnSO₄ H₂O 1690 mg
- ZnSO₄, 7H₂O 1060 mg
- KI 83 mg
- Na₂MoO₄, 2H₂O 25 mg
- CuSO₄, 5H₂O 2,5 mg
- CoCl₂, 6H₂O 2,5 mg
(ou CoCl₂ 1,36 mg)

Autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

Fer (FeNaEDTA) : 2 g dans 500 mL

Autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

Myo-inositol (100X) : 5 g dans 500 mL

Autoclaver 20 min à 120°C et conserver à 4°C

L-glutamine (100X) : 10 g dans 500 mL

Stériliser par filtration (0,45 µm) et conserver à 4°C

b) Préparation de 1L du milieu M&S ½ (pour 4 portoirs de 24 tubes)

| | |
|--------------------|-------|
| Macro-éléments M&S | 50 mL |
| Oligo-éléments | 1 mL |
| Vitamines B | 10 mL |
| Fer | 10 mL |
| Myo-inositol | 10 mL |
| L-glutamine | 10 mL |
| Saccharose | 20 g |

▪ Sous une hotte à flux laminaire (pour conserver la stérilité des solutions), mettre dans une éprouvette de 1L, les macro-éléments M&S, les oligo-éléments, les vitamines B, le fer, le myo-inositol et la L-glutamine.

Les étapes suivantes ne se déroulent plus sous la hotte

- Ajouter l'eau distillée qsp 1L.
- Peser le saccharose dans un bécher et ajouter la solution précédente.
- Mélanger et ajuster le pH entre 5,9 et 6,0 avec du NaOH 1N.
- Transférer dans un bécher inox, ajouter 5,5 g d'agar (HP 696 de KALYS) et porter à ébullition.
- Répartir dans les tubes (~ 10 mL par tube), les fermer avec un bouchon CIV.
- Autoclaver 20 min à 120°C, conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.

c) Multiplication des vitroplants

Rappels :

- l'éthanol 95° sert à flamber les instruments
- l'éthanol 70° est utilisé pour désinfecter les mains et le plan de travail

La multiplication est effectuée sous une hotte à flux laminaire en présence d'un bec bunsen (ou d'une lampe à alcool) pour flamber les instruments.

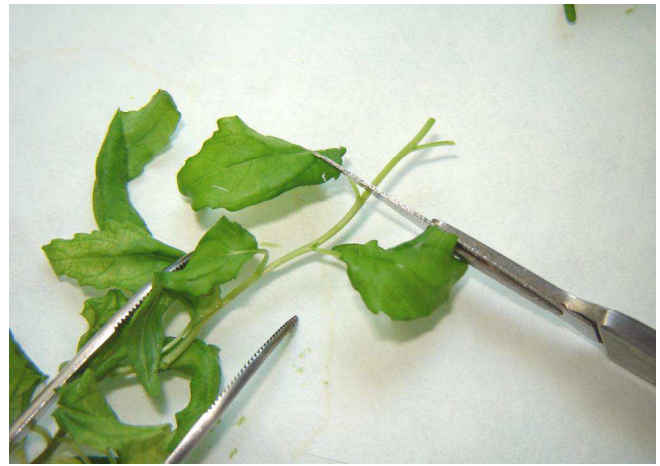
✧ Penser à flamber régulièrement les instruments (à l'aide d'un pot rempli d'éthanol 95°), mais attendre qu'ils aient suffisamment refroidis pour effectuer les découpes.

Elle est réalisée à partir de plants en tube d'environ 10 cm après 2 mois de culture (les plants ne doivent pas être trop âgés, sinon ils ont du mal à faire des racines) et surtout qui ont de grands entre-nœuds.

Les tubes de culture étant conservés à 4°C, il est important de les sortir à l'avance, pour éviter un choc thermique aux micro-boutures.

Différentes étapes de la micropropagation :

- Sortir le plant à l'aide de la grande pince et le déposer sur un morceau de papier filtre stérile.
- Le maintenir avec la pince courbe et éliminer les racines en découpant au scalpel au-dessus du premier entre-nœud.



- Couper le plant entre chaque entre-nœud : choisir de longs entre-nœuds car il faut laisser environ 5-6 mm au-dessous et 2-3 mm au-dessus du nœud pour ne pas couper le bourgeon axillaire (le pétiole de la feuille, au creux duquel il se trouve, est coupée à la même longueur que la tige).



- On obtient ainsi 3 à 5 micro-boutures. Chaque micro-bouture est enfoncée (au 1/3) dans un tube qui contient du milieu M&S 1/2.
- Les tubes sont placés dans une chambre climatique (MAT-CHC-005) dont la photopériode est la suivante :
 - 16 heures de jour à 21-22°C
 - 8 heures de nuit à 18-19°C

Développement de la plante dans le tube:

- 3-4 jours : le bourgeon débourre
- 8-10 jours : apparition des racines
- 15-20 jours : élongation du plant
- 1 mois : le plant mesure environ 2 cm, il est prêt pour l'acclimatation
- 2 mois et plus : le plant peut être multiplié

Extraction d'ADN génomique

Protocole

- Broyer quelques mg de tissus dans de l'azote liquide (éviter toute décongélation du matériel végétal).
- Déposer la poudre dans un tube de 2 ml.
- Ajouter 900 µl de tampon d'extraction additionné de 2% de β-mercaptoéthanol, homogénéiser au vortex.
- Incuber 30 min à 65°C en agitant de temps en temps.
- Ajouter un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Homogénéiser en dégazant.
- Centrifuger 10 min à 13 500 rpm et à 4°C.
- Prélever le surnageant et réaliser un deuxième lavage au chloroforme/alcool isoamylique (24/1).
- Prélever le surnageant et précipiter les ADN avec 1.5 volume d'isopropanol en incubant à 20°C sur la nuit.
- Centrifuger 20 min à 13 500 rpm et à 4°C.
- Eliminer le surnageant et laver 2 fois le culot avec 500 µl d'éthanol 70% glacé.
- Reprendre le culot dans 50 µl d'H₂O stérile additionnée de RNaseA (50 µg/ml final) et incuber 1h à 37°C.

Composition du tampon d'extraction CTAB

CTAB 2% (p/v)

PVP 2% (p/v)

Tris-HCl pH8 100 mM

EDTA pH8 25 mM

NaCl 2 M

Dissoudre le tout dans de l'H₂O stérile en chauffant. Mélanger et autoclaver.

Ajouter 2% de β-mercaptoéthanol juste avant utilisation.


Coloration à la safranine

Protocole

- Éliminer le contenu cellulaire des coupes avec l'hypochlorite de sodium pendant 15-30 minutes
- Neutraliser l'hypochlorite de sodium avec une solution d'acide acétique 1%
- Rincage eau distillée(2-3)
- Colorer avec une solution de safranine à 1% pendant 3-5 minutes ;
- Rincer une fois avec de l'eau ;
- Rincer une fois avec de l'alcool 50% et 70% jusqu'à élimination de l'excès de colorant
- Rincer une fois avec de l'alcool à 100% ;
- Sécher
- Monter sur lamelle avec eukitt (résine synthétique)

Produits (v/v) :

- hypochlorite de sodium 0.5% (eau de javel ou dakin)
- acide acétique 1%,
- safranine à 1%,
- alcool 50%, 70% et 100%,
- eukitt.

| | | |
|---|----------------------------------|--|
|  | Mode Opérateur | Réf. : MO-MET-022 |
| | Purification d'ADN au PEG | Version : 1 Date : 01/09/2011 Page : 1/2 |

1. Objet et domaine d'application

Purifier des produits de PCR ou ADN plasmidique. Le produit de purification est typiquement utilisé pour réaliser des ligations ou recombinaisons dans le cadre de clonage ou encore de transformer des bactéries par électroporation.

2. Documents de référence

Multisite Gateway User manual. Invitrogen.

Cold Spring Harbor Protocols, adapté de "Molecular cloning", Sambrook *et al.*, 2001.

Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol, KR Paithankar, NAR, 1991.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Toute personne voulant réaliser une purification d'ADN.

4. Hygiène et sécurité

Penser à consulter les fiches de sécurité relatives aux différents produits ou consulter l'agent chargé de prévention du service (Nicole BRUNEL). Mettre une blouse et des gants adaptés. Le PEG est non toxique.

5. Principe de la méthode

La précipitation de l'ADN par le PEG-MgCl₂ permet d'éliminer les nucléotides libres et les fragments inférieurs à 150 pb ainsi que les sels.

6. Matériels nécessaires

Centrifugeuse réfrigérante équipée d'un rotor pour microtubes (**Lire le mode d'emploi avant la première utilisation**)

Filtres 0,22 µm

Gants

Micropipettes et pointes de pipetage

Microtubes de 1,5 mL

Seringue

Vortex

7. Réactifs (chimiques et biologiques)




Tampon 1X TE, pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA)

30% PEG 8000 / 30 mM MgCl₂

Eau UP, Tris pH 8,0 [1 M], EDTA pH 8,0 [0,5 M]

Eau UP, PEG 8000, MgCl₂ [2 M]

| Produits Chimiques | Numéro CAS | CMR, OHB et autres dangers | Recommandations : conditions de stockage, d'utilisation, d'élimination... |
|--------------------------------|------------|----------------------------|---|
| EDTA disodium | 6381-92-6 | 2 C | Port de gants et protection oculaire |
| Tris, trométhamine | 77-86-1 | 2 C | Port de gants et protection oculaire |
| Poly(ethylene glycol) PEG 8000 | 25322-68-3 | | |
| MgCl ₂ | 7786-30-3 | | |

| | Rédacteur | Vérificateur | Approbateur |
|------------|---|---|---|
| Nom : | TIXIER Aude | DUSOTOIT-COUCAUD Anaïs | FRANCHEL Jérôme |
| Fonction : | Doctorante | Post-Doctorante | IE |
| Visa : |  |  |  |

Purification d'ADN au PEG

Indications :

OHB : de 1 (faible) à 6 (élevée)

SK ou C : port de protection cutanée et oculaire indispensable

G : manipulation déconseillée pendant la grossesse

A : manipulation déconseillée en cas d'allaitement maternel

Pondération de la durée d'exposition : **ST** impossible, **SD** limitée

8. Contraintes de la méthode

9. Contenu du mode opératoire

a) Préparation du TE 1 X (100 mL)

- Ajouter 1 mL de Tris 1M pH 8 à 0,2 mL d'EDTA 0,5 M et compléter à 100 mL avec de l'eau UP.
- Autoclaver 20 min à 120°C et conserver à température ambiante.

b) Préparation du 30% PEG 8000/ 30 mM MgCl₂ (100 mL)

- Dissoudre 30 g de PEG 8000 dans 100 mL d'eau UP.
- Ajouter 1,5 mL de MgCl₂ 2M.
- Stériliser la solution par filtration à 0,22 µm.
- Stocker la solution à température ambiante.

c) Purification

- Ajouter 3 volumes de TE 1X au produit à purifier ainsi que 2 volumes de PEG 30% 8000/ 30 mM MgCl₂.
- Vortexer.
- Centrifuger à 10 000 g pendant 20 minutes.

Afin d'augmenter le rendement de purification le temps et la vitesse de centrifugation peuvent être augmenté au détriment de la pureté

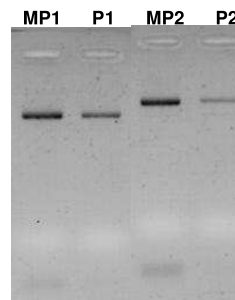
- Retirer le surnageant à l'aide de la P200. Le culot est habituellement invisible.
- Dissoudre le culot dans 20 µL de TE 1X ou d'eau UP suivant l'application finale.

Exemple :

MiniPrep (MP) de vecteur d'expression et
Purification (P) après 30 min 12000 g

P1 = 872 ng/µL

P2 = 1064,7 ng/µL



Micro-moulage de vaisseaux

Préparation du silicone (10g = 3-4 échantillons)

- Préparer une solution de colorant fluorescent UVITEX 1% diluée dans du chloroforme
- Ajouter 1 goutte de solution d'Uvitex pour 1 g de silicone (Rhodorsil RTV-141 A) dans un sac plastique. Mélanger
- Ajouter 0.1g de durcisseur (Rhodorsil RTV-141 B) pour 1 g
- Dégazer le silicone pendant 2 h à l'aide d'une pompe à vide (2 bars)
- Le silicone peut être stocké 24 h à 4 °C ou 1 mois à - 20 °C.

Injection (Chambre à pression)

- Couper l'extrémité du rameau à injecter à l'aide d'une lame de rasoir.
- Prélever 1 ml du silicone dans un petit récipient en verre, plonger l'extrémité du rameau à injecter dans le silicone et installer le récipient dans une chambre à pression. Seule l'extrémité est dans la chambre, le reste du rameau restera à pression atmosphérique durant l'injection.
- Appliquer la pression (minimum 2 bars) pendant 3 heures
- Placer ensuite l'échantillon dans une étuve à 50 °C pendant un minimum de 3 H

Dissolution de l'échantillon (Travailler sous une sorbonne)

La dissolution de l'échantillon se fait sur des petites portions de rameau (1-2 cm³).

- Immerger l'échantillon dans une solution de Franklins (H₂O₂ 3 %, acide acétique 50 % (v/v) pendant 16H à 60°C
- Immerger l'échantillon dans 5 ml d'acide sulfurique* (72 %), réaliser des bains successifs de 2H dans l'acide en renouvelant la solution jusqu'à ce que la solution ne devienne plus noire
- Transférer les échantillons dans un grands volume d'eau *
- Neutraliser le reste de solution avec 300 ml de bicarbonate de sodium (NaHCO₃, 1.3 M), puis transférer les échantillons dans 150 ml de solution d'hypochlorite de sodium (2 M). Laisser les échantillons sous la Sorbonne 30 minutes à 1H (gaz nocifs). Les micro moulages sont blanchis par l'hypochlorite de sodium, les prélever, les transférer dans un volume d'eau et les observer au microscope.

***Précaution d'utilisation de l'acide sulfurique**

RESUME

vulnérabilité du xylème à la cavitation est un caractère déterminant pour la tolérance des arbres à une sécheresse extrême. La connaissance des bases moléculaires de caractère serait utile pour prévoir le comportement des populations naturelles et pour orienter les choix de culture dans un contexte de changement climatique. Ce travail de thèse porte sur les bases physiques et génétiques de la vulnérabilité à la cavitation en ciblant les ponctuations car il est désormais bien admis que les ponctuations des vaisseaux du xylème sont des structures clés de ce caractère. Nous proposons un modèle mécanique de comportement des ponctuations lors de la cavitation. Il démontre comment la géométrie des ponctuations détermine leurs propriétés mécanique et permet d'expliquer la variabilité interspécifique de la vulnérabilité à la cavitation. Pour appréhender les bases génétiques, deux approches ont été développées. D'une part, nous avons construit des lignées transgéniques de peupliers modifiées pour le métabolisme des pectines. D'autre part, Nous avons montré qu'*Arabidopsis thaliana* est une plante modèle qui permet prospecter les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. L'étude des lignées transgéniques de peuplier et d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* modifiés pour l'expression de polygalacturonases met en évidence l'implication de ces enzymes et plus généralement des pectines dans la vulnérabilité à la cavitation. L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer un rôle des pectines au niveau de l'anneau de la membrane des ponctuations, dans la vulnérabilité à la cavitation.

ABSTRACT

Vulnerability to cavitation is an important feature for drought tolerance of trees. Understanding of the molecular basis of vulnerability to cavitation would be useful to predict the behavior of natural populations in the context of changing climate. This work focuses on the physical and genetic basis of vulnerability to cavitation and targets pits because they represent main candidates for the spread of embolism in wood. We propose a model of the mechanical behavior of pits while cavitation occurs. The model shows how the pits geometry influences their mechanical properties and allows explaining interspecific variability of vulnerability to cavitation. On one hand, we constructed transgenic poplars modified for pectin metabolism. On the other hand, we showed that *Arabidopsis thaliana* is a model plant that can be used for the study of the molecular basis of vulnerability to cavitation. Studies of poplars' transgenic lines and *Arabidopsis thaliana* mutant modified for a polygalacturonase highlights the involvement of pectins in vulnerability to cavitation. Our results suggest that pectins that are located on the annulus of the pit membrane have a role in vulnerability to cavitation.

Mots clés : cavitation, xylème, ponctuations, pectines, sécheresse, hydraulique, peuplier.