



MASTER II Biologie et Environnement

SPECIALITÉ : Génomique, Ecophysiologique et Production Végétale (GEPV)

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR:

Estelle NOYER

SUJET:

Implication des aquaporines PIP dans la réponse gravitropique chez le peuplier

Responsables du Stage:

Patricia ROECKEL-DREVET
Jean-Stéphane VENISSE

UMR PIAF 547
Université Blaise Pascal
Les Cézeaux, 24 Avenue des Landais
63177 Aubière



Juin 2013

Résumé

Le bois de tension résulte d'une maturation différentielle de cellules issues du cambium entre les côtés opposés du tronc de l'arbre pour permettre son redressement lorsque celui-ci a été incliné. Les aquaporines PIP, protéine-canaux qui facilitent le passage de l'eau à travers la membrane plasmique, semblent impliquées dans la formation du bois normal. Cette étude est basée sur l'hypothèse que les aquaporines PIP seraient impliquées dans la formation du bois de tension en régulant différentiellement les flux d'eau entre les deux côtés de la tige après gravistimulation.

Une approche écophysiological a permis de mettre en évidence des modifications des flux d'eau locaux de la face supérieure à la face inférieure de la tige inclinée à 35°. Par qRT-PCR, des modulations d'expression des PIP ont été montrées. Des techniques cytologiques ont permis de détecter la modification de la distribution des PIP dans la tige suite à une stimulation gravitropique. Ces résultats suggèrent que les mouvements d'eau engendrés par l'inclinaison seraient dus à des modifications du transport radial d'eau dans la tige et ce, *via* la régulation cellulaire des aquaporines PIP.

Mots-clés : gravitropisme, eau, aquaporine, PIP, peuplier, psychromètre, PCR quantitative, hybridation- immunolocalisation *in situ*

Abstract

Tension wood results from the differential maturation of wood cells derived from the cambium between opposite sides of the trunk of the tree to achieve its adaptive reorientation after tilting. Aquaporins PIP, channel proteins which facilitate the passage of water across the plasma membrane seem to be involved in the formation of normal wood. This study is based on the hypothesis that PIP aquaporins are involved in the formation of tension wood by differentially regulating the water flow between the two sides of the stem after gravistimulation.

Using an ecophysiological approach, changes in local water flow from the upper to the lower side of the 35° inclined stem were highlighted. Using qRT-PCR, modulations of expression of PIP were observed. Cytological techniques allowed to detect the change of PIP distribution in the stem after gravistimulation. These results suggest that the water movements caused by the inclination may be due to changes in radial transport of water in the stem and this, *via* the cellular regulation of PIP aquaporins.

Keywords: gravitropism, water, aquaporin, PIP, poplar, psychrometer, quantitative PCR, *in situ* hybridization- immunolocalization

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Jean-Louis Julien de m'avoir accueilli au sein de l'UMR 547 PIAF-INRA UBP afin d'effectuer mon stage de Master 2^{ème} année.

Je souhaite également remercier mes deux maîtres de stage, Patricia Roeckel-Drevet et Jean-Stéphane Venisse, de m'avoir encadré, conseillé et soutenu tout au long de ce stage. Je les remercie particulièrement pour leur disponibilité et leur patience à mon égard lors de ce stage et de la rédaction de ce rapport.

Merci à Eric Badel pour ses explications et son aide avec le psychromètre. Un grand merci à Kévin Tocquard, pour les séances de broyages et sa disponibilité.

Je tiens à remercier Jérôme Franchel, pour m'avoir fait une place dans son bureau et ses conseils avisés en biologie moléculaire. Merci à Nicole Brunel, pour sa patience et ses explications précieuses de cytologie.

Mes remerciements sont aussi adressés à Jérôme N'Gao pour ses conseils et ses explications de conductance stomatique. Merci à Béatriz Muries-Bosh pour son aide avec le psychromètre et sa calibration et à David Lopez pour ses lumières sur les aquaporines.

Pour leurs conseils, leur disponibilité et les soirées au Nota merci à Ludovic Martin, Aude Tixier, Julie Bednarek et Boris Fumanal.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans nommer Sébastien Ribeiro et Emilie Froussart, mes compagnons de Master. Merci pour les pauses café et votre bonne humeur quotidienne qui m'a permis de profiter au plus de ce stage.

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de l'UMR PIAF pour les aides et conseils qu'ils m'ont offert ainsi que leur accueil chaleureux.

Abréviations

ADNc : Acide DésoxyriboNucléotique Complémentaire

ANOVA : Analysis Of VAriance

ARN : Acide RiboNucléotique

ARNtx : ARN totaux

BSA : Bovine Serum Albumine

CO₂ : Dioxyde de carbone

CTAB : CeTyltrimethylAmmonium Bromide

DIG-UTP : Digoxigenin-11-UTP

Gs : conductance stomatique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

MIP : Membrane Intrinsic Proteins

NGS : Normal Goat Serum

NIP : NOD-26-like Intrinsic membrane Proteins

PBS : Phosphate Buffered Salin

PCR : Polymerase Chain Replication

PIAF : Physiologie et Physique Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier

PIP : Plasma membrane Intrinsic Proteins

Pta : *Populus tremula x alba*

SIP : Small basic Intrinsic Proteins

TAE : Tris-Acetate-EDTA

TIP : Tonoplasts Intrinsic Proteins

XIP : X Intrinsic Proteins

Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Synthèse Bibliographique	2
2.1. L'eau.....	2
2.2. Les aquaporines	4
2.3. Le gravitropisme.....	6
2.4. Eau, aquaporines et gravitropisme.....	8
2.5. Objectifs de l'étude.....	9
3. Travail expérimental	10
3.1. Matériel végétal	10
3.2. Mise en place des contraintes gravitropiques et prélèvements.....	10
3.3. Mesure du potentiel hydrique de la partie basale de la tige.....	10
3.4. Mesure de la conductance stomatique et de la transpiration foliaire.....	12
3.5. Extraction des ARN totaux, Synthèse des ADNc.....	12
3.6. PCR quantitative en temps réel	12
3.7. Préparation du matériel végétal en vue d'une hybridation <i>in situ</i> ou d'une immunolocalisation <i>in situ</i>	13
3.8. Hybridation <i>in situ</i>	13
3.9. Immunolocalisation <i>in situ</i>	14
4. Résultats	15
4.1. Mesure de potentiel hydrique dans la partie basale de la tige	15
4.2. Conductance stomatique.....	15
4.3. PCR quantitative.....	16
4.4. Hybridation <i>in situ</i>	17
4.5. Immunolocalisation <i>in situ</i>	18
5. Discussion.....	19
5.1. Modifications de l'état hydrique.....	19
5.2. Modulation de l'expression des aquaporines PIP	21
6. Conclusions – Perspectives.....	23

1. Introduction

De par ses propriétés physico-chimiques, l'eau est d'une importance considérable pour toute cellule vivante. Elle est essentielle pour la croissance et le développement du végétal. Par exemple, après la mitose qui a lieu dans les méristèmes, la croissance des cellules s'effectue en partie grâce à la pression de turgescence exercée contre les parois primaires causée par l'entrée d'eau dans la cellule. De plus, la gestion de l'eau dans la plante est au cœur des réponses du végétal face aux stimuli environnementaux. Ainsi, lorsqu'une plante herbacée est placée horizontalement, la tige et la racine principale vont se réorienter respectivement vers le haut (gravitropisme négatif) et vers le bas (gravitropisme positif) par des réponses de croissance adaptées. Chez les plantes herbacées, qui ne possèdent que des méristèmes primaires, cette réorientation des organes se fera par croissance différentielle des cellules nouvellement formées entre les côtés supérieurs et inférieurs des organes. Pour le redressement de la tige, les cellules en croissance du côté inférieur, vont subir un grandissement plus important que celles du côté supérieur. Ce grandissement s'accomplit grâce à une forte entrée d'eau dans ces cellules. Le même mécanisme intervient pour la réorientation de la racine, avec cependant une croissance cellulaire plus forte du côté supérieur de l'organe.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au sein de l'UMR PIAF (Physique et Physiologique Intégrées de l'Arbre Fruitier et Forestier) dont la thématique générale est la compréhension des réponses physiologiques et moléculaires des arbres face à un environnement fluctuant, et plus particulièrement face aux contraintes mécaniques et hydriques. Les plantes ligneuses possèdent non seulement des méristèmes primaires, qui assurent la croissance primaire des organes, mais aussi des méristèmes secondaires. Le cambium, méristème secondaire, est à l'origine de la formation du bois. Ainsi lorsqu'un arbre est incliné deux mécanismes de redressement sont mis en jeu au niveau de la tige. La réorientation de l'axe va s'effectuer à la fois par des phénomènes d'élongation différentielle, comme chez les plantes herbacées dans les zones en croissance primaire, et par un fonctionnement différentiel du cambium qui va produire de part et d'autre de l'axe, un bois de réaction face à un bois opposé dans les zones en croissance secondaire. Les contraintes asymétriques générées au sein de ces différents types de bois permettent le redressement de l'axe. De nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'eau dans la réorientation des axes

en croissance primaire. A notre connaissance, aucun travail n'a été rapporté dans la littérature concernant la gestion de l'eau dans le tronc de l'arbre suite à son inclinaison, et indiquant si l'eau est impliquée dans la réponse différentielle du cambium conduisant à la formation des bois de réaction et opposé.

En préambule à la présentation des travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire, et qui visent à répondre à cette question, une première partie bibliographique montrera :

- L'importance de l'eau et du statut hydrique des plantes pour le grandissement cellulaire, l'auxèse, et pour la croissance du végétal ;
- Les protéines transmembranaires qui participent aux flux d'eau dans la plante et leur implication dans divers phénomènes physiologiques ;
- Les réponses des plantes aux contraintes gravitropiques conduisant à la formation de bois de réaction.

2. Synthèse Bibliographique

2.1. L'eau

L'eau représente environ 80% de la masse de matière fraîche chez les végétaux. Elle participe en tant que substrat aux réactions d'hydrolyse ou d'oxydation (photolyse de l'eau lors de la photosynthèse). En tant que solvant, elle rend possible les réactions biochimiques. De plus, la polarité de la molécule d'eau permet l'établissement de liaisons hydrogènes intermoléculaires qui induisent la cohésion entre ces molécules. Ces caractéristiques permettent entre autres la mise en place de la tension superficielle et des forces de capillarité qui régissent les mouvements d'eau dans la plante.

2.1.1. Statut hydrique des plantes

La quantification de l'état d'énergie de la molécule d'eau permet de caractériser le statut hydrique des plantes. Pour cela, la notion de potentiel hydrique est utilisée. Elle correspond à l'énergie libre de l'eau rapportée à son volume molaire. Le potentiel hydrique est exprimé en MPa. Il est défini par rapport à une solution d'eau pure dans les mêmes conditions de température et de pression atmosphérique, dont le potentiel est par convention égal à zéro. Ainsi, le potentiel hydrique est toujours inférieur ou égal à zéro.

Pour une cellule végétale, la valeur du potentiel hydrique est déterminée par deux principaux composants opposés. Le premier est le potentiel de turgescence qui représente la pression mécanique exercée par la paroi végétale sur les molécules d'eau et dont l'intensité

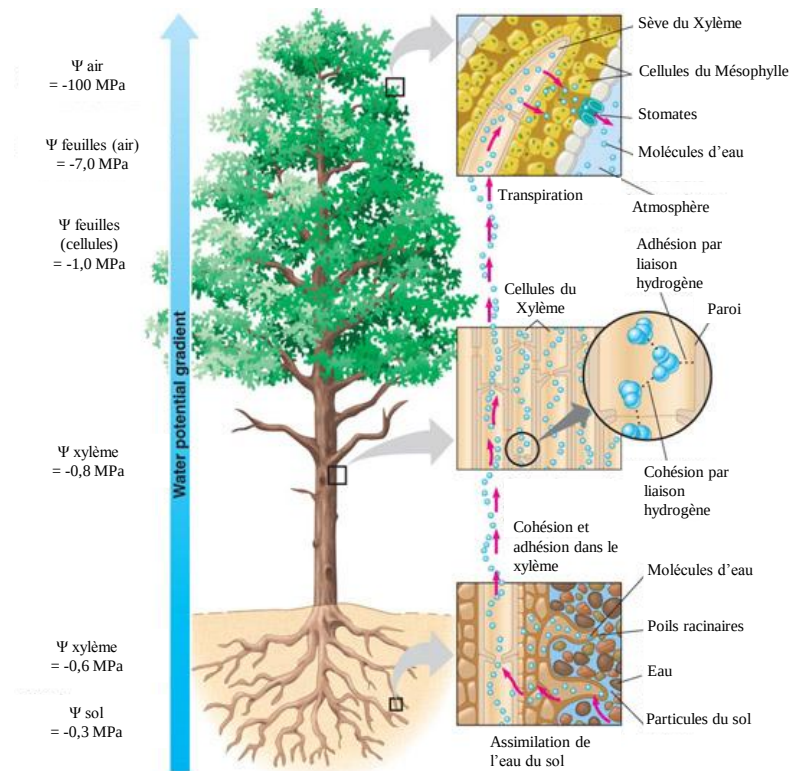


Figure 1 : Schéma du continuum sol-plante-atmosphère décrivant les voies de circulation de l'eau dans un arbre (Wortemann, 2011).

L'eau est absorbée du sol au niveau des racines, puis monte verticalement à travers le xylème des racines aux feuilles. Enfin, l'évaporation se déroule au niveau des feuilles, par les stomates.

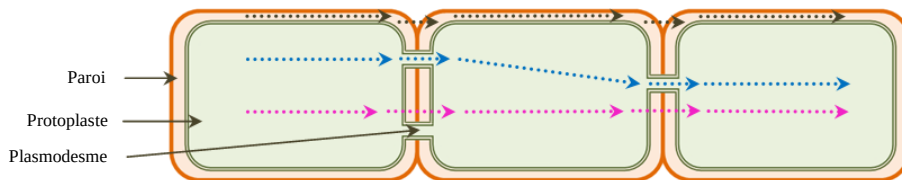


Figure 2 : Schéma simplifié des voies utilisées par l'eau à travers les cellules vivantes.

En noir : voie apoplasme. En bleu : voie symplasmique. En rose : voie transcellulaire.

dépend de l'état de turgescence de la cellule. Généralement, cette pression va contrer l'entrée d'eau dans la cellule. Le second composant est le potentiel osmotique de la cellule sur les molécules d'eau. L'eau se déplace toujours du potentiel hydrique le moins négatif (compartiment le plus hydraté) au potentiel le plus négatif (compartiment le moins hydraté).

2.1.2. Continuum sol-plante-atmosphère

Chez les Angiospermes, l'absorption de l'eau et des sels minéraux du sol s'effectue grâce au système racinaire, via les poils absorbants. Cette entrée d'eau au niveau des poils absorbants est possible lorsque le potentiel hydrique de ces cellules est plus négatif que celui du sol. L'eau et les sels minéraux forment la sève brute qui circule jusqu'aux feuilles dans les éléments conducteurs du xylème tels que les vaisseaux. Cette montée de sève est expliquée par la théorie de « Tension-Cohésion » (Dixon et Joly, 1894), « tension » faisant référence aux forces générées dans la sève, et « cohésion » à celle des molécules d'eau entre elles. Le continuum sol-plante-atmosphère définit alors l'ascension de l'eau des racines vers l'atmosphère grâce au flux hydrique généré par les différences de potentiel entre les compartiments de la plante (*cf.* **Figure 1**). Une colonne d'eau est formée dans les vaisseaux du xylème jusqu'aux feuilles, lieu de l'évapo-transpiration. L'évapo-transpiration est à l'origine des forces de tension assurant l'ascension de la sève dans l'arbre. Les cellules de la cavité sous-stomatique possèdent des parois nano-poreuses permettant la formation de ménisques air-eau de quelques nanomètres de diamètre. Ces ménisques constituent l'interface entre la phase liquide et la phase gazeuse. La vaporisation de l'eau au niveau des ménisques génère des tensions capillaires qui entraînent une diminution du potentiel hydrique dans les régions adjacentes. Les zones proches de la vaporisation de l'eau fonctionnent donc à des potentiels hydriques plus faibles que les zones proches des racines. Un gradient de potentiel hydrique des poils absorbants des racines aux feuilles est alors généré. Il est responsable du sens et de l'intensité du flux de sève.

2.1.3. Trajet de l'eau

Après avoir pénétré dans la plante au niveau des poils absorbants des racines, l'eau doit gagner les vaisseaux du xylème à travers les cellules vivantes. Dans ce cas, trois voies s'offrent à elle : apoplasmique, symplasmique et transcellulaire (*cf.* **Figure 2**). La voie préférentielle de l'eau est variable selon les espèces, l'organe, l'âge et l'état physiologique de la plante (Chrispeels et Maurel, 1994 ; Hukin *et al.*, 2002).

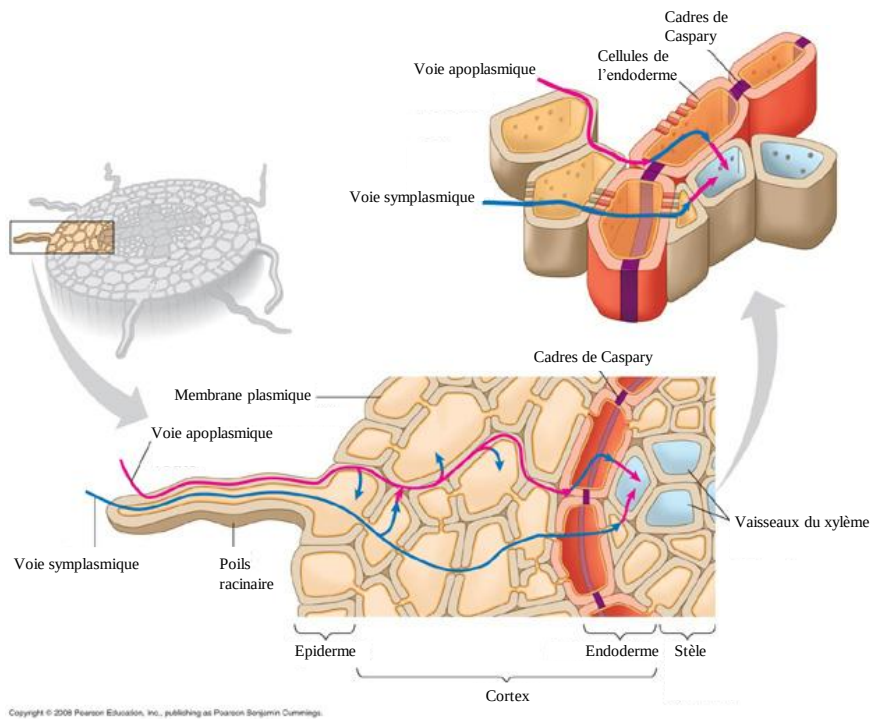


Figure 3 : Schéma simplifié du trajet radial de l'eau des poils absorbants des racines aux vaisseaux du xylème (Source : Plant and Soil Sciences).

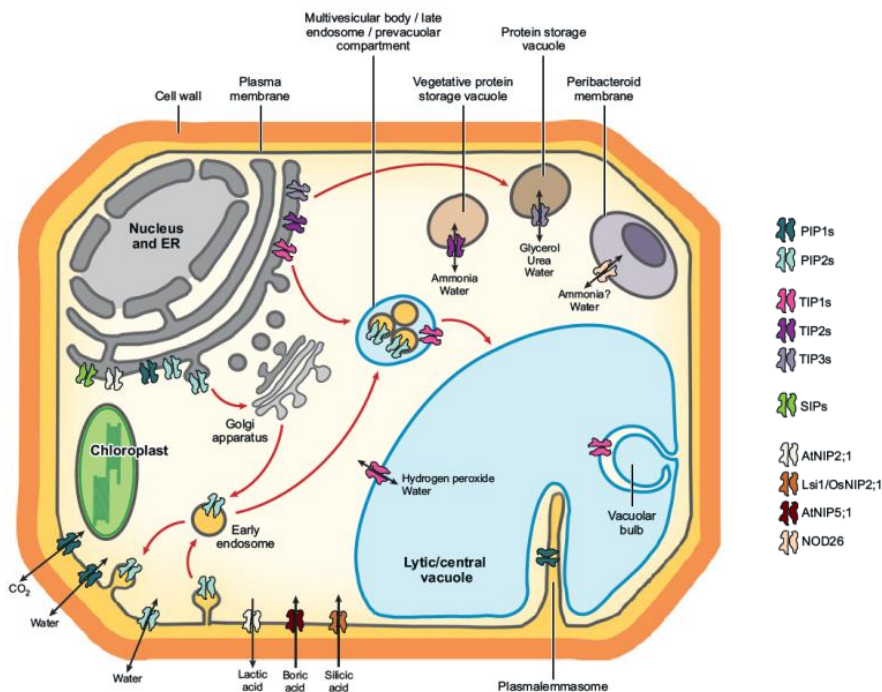


Figure 4 : Récapitulatif de la répartition des aquaporines dans la cellule végétale (Maurel *et al.*, 2008).

Cell wall : paroi cellulaire, Plasma membrane : membrane plasmique, Prevacuolar compartment : compartiment prévacuolaire, Vegetative protein storage vacuole, protein storage vacuole : protéinoplaste, Peribacteroid membrane : membrane pér bactéroïde, Nucleus : noyau, ER : réticulum endoplasmique, Golgi apparatus : appareil de Golgi, Chloroplast : chloroplaste, Early endosome : jeune endosome, Vacuolar bulb : invagination vacuolaire, Central vacuole : vacuole.

Water : eau, Lactic acid : acide lactique, Boric acid : acide borique, Silicic acid : acide silicique, Ammonia : ammoniaque, Urea : urée.

L'apoplasme est un système continu comprenant les parois cellulaires, le milieu intercellulaire et les cellules mortes, où l'eau peut circuler. Elle ne traverse pas la membrane plasmique. Les cadres de Caspary de l'endoderme arrêtent l'eau de l'apoplasme (cf. **Figure 3**). Ces cadres composés de subérine imperméable forcent l'eau à changer de voie pour passer dans le péricycle. Le symplasme correspond au réseau des cytoplasmes des cellules interconnectées par les plasmodesmes. La traversée de la membrane plasmique doit s'effectuer pour rentrer dans le symplasme. La voie transcellulaire est le trajet de l'eau de cellule à cellule, et qui implique des traversées de la membrane plasmique à chaque entrée et sortie de la cellule. La diffusion de l'eau à travers la bicouche lipidique est limitée. Des canaux spécifiques appelés aquaporines permettent de faciliter ces flux d'eau entrant et sortant.

2.2. Les aquaporines

Les aquaporines contribuent à la régulation des mouvements d'eau dans les cellules végétales (Chaumont *et al.*, 2005). Elles appartiennent à une super famille de protéines : les MIPs (Major Intrinsic Proteins) (Chrispeels et Maurel, 1994). Le terme aquaporine était initialement restreint aux MIPs qui sont des canaux à eau stricts. Actuellement, toutes les MIPs sont appelées « aquaporines » qui sont alors des protéines-canaux facilitant le transport de l'eau et/ou de petits solutés à travers les membranes biologiques.

Les MIPs ont été identifiées chez la plupart des organismes vivants (Soto *et al.*, 2012). Chez les plantes, un grand nombre d'isoformes est observé (Maurel, 2007). En effet, 35 gènes chez *Arabidopsis thaliana* et 33 chez *Oriza sativa* ont été identifiés (Johanson *et al.*, 2001 ; Sakurai *et al.*, 2005). En ce qui concerne les espèces ligneuses, 55 MIPs ont été mises en évidence chez *Populus trichocarpa* (Lopez *et al.*, 2012). Cette diversité s'exprime aussi au niveau des profils d'expression : certaines MIPs sont spécifiques d'un tissu donné et d'un stade de développement (Maurel *et al.*, 2008).

2.2.1. Sous-familles et Structure

D'après leur homologie de séquences, les aquaporines/MIPs peuvent être classées en 5 sous-familles : les Plasma membrane Intrinsic Proteins (PIPs), les Tonoplasts Intrinsic Proteins (TIPs), les NOD-26-like Intrinsic membrane Proteins (NIPs), les Small basic Intrinsic Proteins (SIPs) et les X Intrinsic Proteins (XIPs). Tous les compartiments subcellulaires ayant besoin de contrôler leurs flux d'eau, les aquaporines sont réparties de manière spécifique dans les membranes biologiques (cf. **Figure 4**) (Maurel *et al.*, 2008 et 2009).

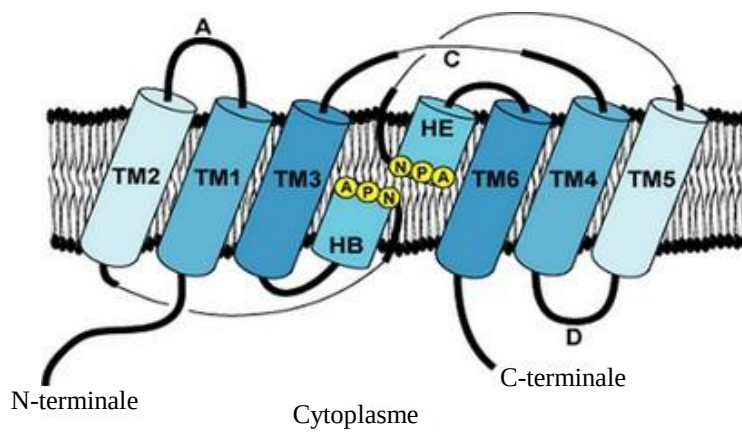


Figure 5 : Schéma d'un monomère d'une aquaporine (Hachez *et al.*, 2006).

TM : domaine TransMembranaire ; H : Hélice.

En grande majorité, les aquaporines sont des tétramères entre 23 à 31 kDa. Chaque monomère présente 6 domaines transmembranaire liés par 5 boucles localisées sur les bords intra- et extra-cytoplasmiques de la membrane. Les extrémités N- et C-terminales sont exposées dans le cytosol (*cf. Figure 5*). Les boucles B et D sont cytosoliques tandis que les boucles A, C et E sont extracellulaires (Maurel *et al.*, 2008). Les boucles B et E présentent un motif NPA très conservé. Ce motif peut interagir avec les autres domaines transmembranaires pour former le pore de l'aquaporine (Maurel, 2007). La taille de ce dernier est variable suivant les types de solutés transportés (Maurel *et al.*, 2008).

2.2.2. Les PIPs

Les protéines PIPs sont les aquaporines les plus étudiées. Leur capacité de transport de l'eau à travers la membrane plasmique a été démontrée sur des ovocytes de Xénope (Tungngoen *et al.*, 2009). Elles sont présentes dans la membrane plasmique ainsi que dans ses invaginations, les plasmalemmasomes (Maurel *et al.*, 2008). Cette localisation leur permet de faciliter les échanges entre l'apoplaste et la vacuole (Chaumont *et al.*, 2005). Cette sous-famille peut être divisée en 2 groupes (PIP1 et PIP2) de par la taille de leurs extrémités N- et C-terminales et leur fonction de transport. Tandis que les PIP2 sont les plus efficaces dans le transport de l'eau, les PIP1 transportent de l'eau et du CO₂. Cependant, ces 2 types de PIPs co-exprimées semblent agir en synergie après un processus d'hétérotétramérisation afin de potentialiser le passage de l'eau (Maurel *et al.*, 2008).

2.2.3. Régulations

Les aquaporines font l'objet de plusieurs modifications post-traductionnelles qui ont un impact sur la perméabilité des membranes et le trajet de l'eau dans les tissus (Chaumont *et al.*, 2005 ; Maurel *et al.*, 2009). La phosphorylation est le premier mécanisme de régulation de l'activité des aquaporines. Plus particulièrement, la phosphorylation des extrémités N- et C-terminales modulerait l'ouverture du pore (Chaumont *et al.*, 2005). Les protéines PIPs végétales possèdent un mécanisme supplémentaire unique, la méthylation (Santoni *et al.*, 2006). Actuellement, peu de documentation sur l'impact de cette modification est disponible. Il a été démontré qu'un pH acide ou les cations divalents inhibent l'activité des aquaporines (Tournaire-Roux *et al.*, 2003 ; Chaumont *et al.*, 2005). La glycosylation est importante pour l'adressage des protéines du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (Chaumont *et al.*, 2005 ; Hachez *et al.*, 2012). De plus, la distribution spatio-temporelle des aquaporines impliquées dans la voie de transport de l'eau dans les racines est régulée par l'auxine (Maurel

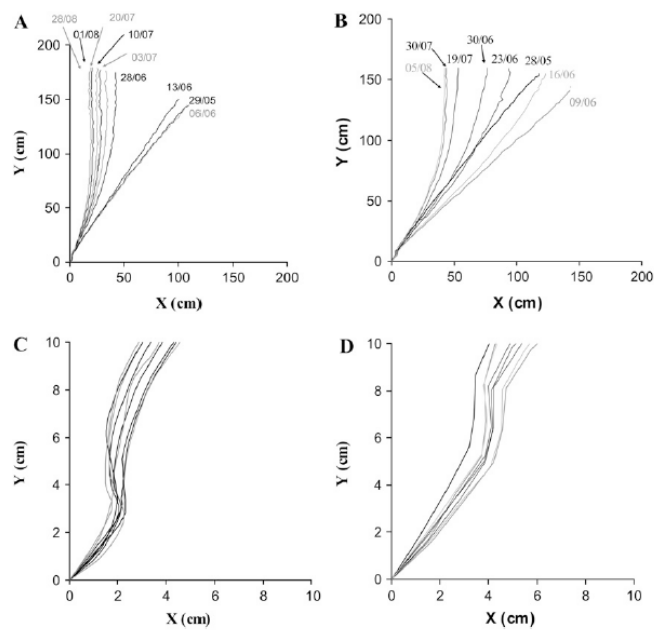


Figure 6 : Cinématique de redressement d'un arbre (Coutand *et al.*, 2007).

Chaque ligne représente la numérisation du tronc pendant la réponse gravitropique. La date de numérisation est indiquée à côté de chaque ligne. Deux cinétiques sont observables en A et B. Les graphiques C et D représentent respectivement un zoom effectué à la base des troncs A et B.

et al., 2009 ; Péret *et al.*, 2012). Parmi les 3 trajets possibles de l'eau dans les tissus, la voie transcellulaire assurée par les aquaporines est soumise à de nombreuses régulations.

2.2.4. Fonctions physiologiques

Plusieurs études montrent l'implication des aquaporines dans des processus physiologiques tels la germination, le mouvement des stomates et des feuilles ou la mort des plantes (Maurel *et al.*, 2008 et 2009). De par leurs fonctions, elles jouent un rôle vis-à-vis de la régulation de la conductivité hydraulique des cellules (Javot et Maurel, 2002 ; Maurel *et al.*, 2008 ; Kaldenhoff *et al.*, 2008). La quantité de transcrits ainsi que l'activité protéique des aquaporines peuvent être modulées en réponse à certaines contraintes fluctuantes comme la lumière, le stress hydrique et les cycles gel-dégel (Chrispeels et Maurel, 2001 ; Sakr *et al.*, 2003 ; Alexandersson *et al.*, 2005 ; Cochard *et al.*, 2007). En particulier, elles interviendraient dans la réparation de l'embolie des vaisseaux du xylème qui peut intervenir lors de stress hydriques sévères ou des cycles de gel-dégel qui ont lieu en hiver dans les vaisseaux des troncs d'arbres (Secchi *et al.*, 2010 ; Perrone *et al.*, 2012). Enfin, il existe un lien direct entre les aquaporines et l'élongation cellulaire (Hukin *et al.*, 2002). Muto *et al.* (2011) ont montré chez le riz qu'elles permettent l'augmentation de l'influx d'eau dans la vacuole de la cellule, la conduisant vers un état de turgescence.

2.3. Le gravitropisme

Au cours de leur développement, les végétaux doivent s'adapter aux divers stimuli du milieu environnemental tels que la lumière, la température et la disponibilité en eau. Le vent, les tempêtes ponctuelles, l'inclinaison du sol ont aussi un impact sur leur développement en provoquant des contraintes mécaniques. Lorsqu'un arbre en croissance est incliné, par exemple par le poids de la neige, il va se redresser jusqu'à ce qu'il soit vertical. La plante perçoit le champ de gravité terrestre et y répond par une croissance adaptée. Le gravitropisme définit ainsi la croissance orientée en fonction de la gravité.

Les études des réponses des végétaux à un stimulus gravitropique ont majoritairement été conduites sur les plantes herbacées et au niveau des racines (Banclafior et Manson, 2003). En ce qui concerne les réponses des parties aériennes des arbres suite à une inclinaison par rapport à la verticale, la littérature est plus rare. Néanmoins, Coutand *et al.* (2007) décrivent une cinématique de redressement chez le peuplier. L'axe se redresse en respectant trois étapes : une phase de latence, une phase de redressement et enfin, une phase de décourbure anticipée (*cf.* **Figure 6**). Deux moteurs permettent le redressement de la partie aérienne. Dans

les zones en croissance primaire, la réorientation est obtenue par une élongation différentielle des cellules, préférentiellement stimulée d'un côté de l'organe. Dans les zones où le cambium, méristème secondaire qui assure la croissance radiale, est actif, la réorientation se fait par des phénomènes de maturation différentielle entre les deux côtés de la tige (Moulia et Fournier, 2009). Ces mécanismes sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.3.1. Redressement de la tige dans les zones en croissance primaire

La croissance primaire est définie par l'élongation cellulaire via l'augmentation du volume des cellules au niveau des méristèmes primaires. Trois principales étapes ont été identifiées : (i) l'augmentation de la plasticité de la paroi cellulaire ; (ii) la synthèse de nouveaux composants et (iii) l'accroissement de la pression de turgescence au sein de la vacuole. Thimann et Bonner (1932) ont démontré l'importance de l'auxine dans l'élongation de coléoptiles. Cette hormone va stimuler la production et l'activation des pompes à protons. Il va en résulter une acidification du pH de la paroi cellulaire qui va engendrer l'activation d'enzymes : les expansines. Elles vont rompre les liaisons hydrogène entre les microfibrilles de cellulose et d'autres composants de la paroi cellulaire, ce qui va augmenter la plasticité de celle-ci. Parallèlement, l'efflux de protons va favoriser l'influx d'ions K^+ et d'eau. Le volume de la vacuole va alors augmenter et la pression de turgescence au sein de la cellule va s'accroître. De plus, l'auxine va activer la transcription de certains gènes codant de nouveaux composants de la paroi, lui permettant de s'étendre de manière irréversible (Català *et al.*, 2000).

Chez les plantes herbacées, le redressement des parties aériennes suite à une stimulation gravitropique est corrélé à une augmentation d'auxine le long du côté inférieur de la tige. Cette courbure est donc induite par l'effet stimulateur de l'auxine sur les cellules dans la zone d'élongation de la tige (Evans et Ishikawa, 1997). Cependant, Schnabl *et al.* (2002) démontrent chez le maïs, que la réponse différentielle peut se produire sans gradient d'auxine entre les deux côtés de la tige suggérant l'existence d'autres mécanismes indépendants de cette phytohormone.

2.3.2. Redressement de la tige dans les zones en croissance secondaire

Chez les arbres, la croissance secondaire est définie par l'activité du cambium, méristème secondaire qui assure la formation du bois. Deux types cellulaires composent le cambium : (i) les initiales radiales, futurs rayons ligneux et (ii) les initiales fusiformes se différencieront vers l'intérieur du tronc en xylème secondaire (ou le bois *sensus stricto*) ou

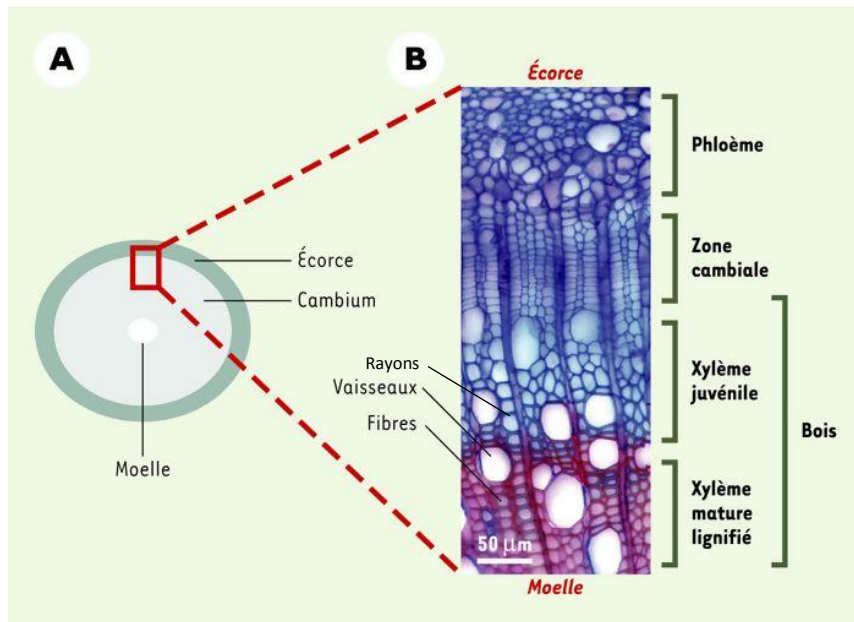


Figure 7 : **A.** Schéma anatomique d'un tronc d'arbre. Le rectangle correspond à la place de la coupe de la partie B. **B.** Coupe transversale d'une tige de peuplier après coloration au safranine/bleu astra (Pilate, 2003).

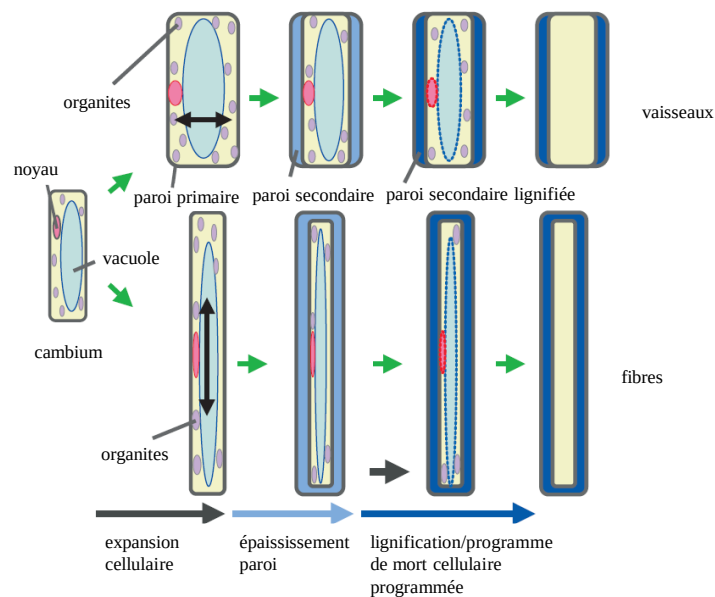


Figure 8 : Développement du xylème secondaire chez les angiospermes (Samuels *et al.*, 2006).

Les étapes de la différenciation sont : (1) expansion cellulaire (2) dépôt des polysaccharides de la paroi secondaire (3) lignification et mise en place de la mort cellulaire programmée (PCD).

vers l'extérieur du tronc en phloème secondaire (encore appelé écorce). Les fibres contenues dans le bois sont allongées dans le sens axial. Ces éléments remplissent le rôle de soutien mécanique. Les vaisseaux sont des cellules larges et petites dont la paroi a disparu aux extrémités, les laissant « ouverts » pour conduire la sève brute (Miyashima *et al.*, 2013). Les rayons ligneux assurent le transfert radial des assimilats et de l'eau entre le phloème et le xylème (cf. **Figure 7**). La **Figure 8** décrit la formation du bois qui se déroule en cinq étapes majeures : (i) la division des cellules à partir des cellules initiales du cambium; (ii) l'élongation des cellules et l'élargissement en diamètre de la tige ; (iii) le dépôt d'une paroi secondaire ; (iv) la mort programmée des cellules xylémiennes et enfin, (v) la formation du bois par imprégnation des cellules de composées phénoliques (Samuels *et al.*, 2006 ; Déjardin *et al.*, 2010). La lignification du bois est très importante pour que celui-ci puisse remplir ses rôles dans le soutien de la tige, le transport de l'eau et la croissance de l'arbre (Coleman *et al.*, 2008 ; Voelker *et al.*, 2011).

La clé du redressement du tronc réside dans la croissance radiale et le processus de maturation du bois (Coutand *et al.* 2007). Un fonctionnement différentiel des cellules du cambium va conduire à la formation d'un bois spécifique, le bois de réaction (Telwski, 2006). Ce bois de réaction est précisément appelé bois de compression chez les gymnospermes et bois de tension chez les angiospermes (Jourez, 1997a). Il se développe sur la face inférieure de la tige pour le premier ou sur la face supérieure de la tige pour le second. Le bois de tension se distingue par ses propriétés morphologiques et physiologiques particulières (Moulia et Fournier, 2009 ; Jourez, 1997a). Sa principale caractéristique est la diminution du nombre de vaisseaux (Jourez *et al.*, 2001). Selon les espèces considérées, il présente certains caractères comme la modification de la forme des vaisseaux, du diamètre des fibres, de l'épaisseur des parois ou la présence de fibres gélatineuses, appelées fibres G. La couche de fibres G possède un faible taux de lignine et une forte teneur en microfibrilles de cellulose (Joseleau *et al.*, 2004). Les microfibrilles sont parallèles entre elles et orientées selon l'axe longitudinal de la cellule contrairement à celles des autres couches de la paroi secondaire (cf. **Figure 9**). Les modifications de maturation entre le bois opposé (normal) et le bois de tension au sein de la paroi cellulaire des fibres à partir du cambium seraient à l'origine du redressement de la tige (Jourez, 1997b).

2.4. Eau, aquaporines et gravitropisme

Peu d'études rapportent l'impact d'une sollicitation gravitationnelle sur les mouvements d'eau au sein de la plante. Dans les zones en croissance primaire, Hu *et al.*

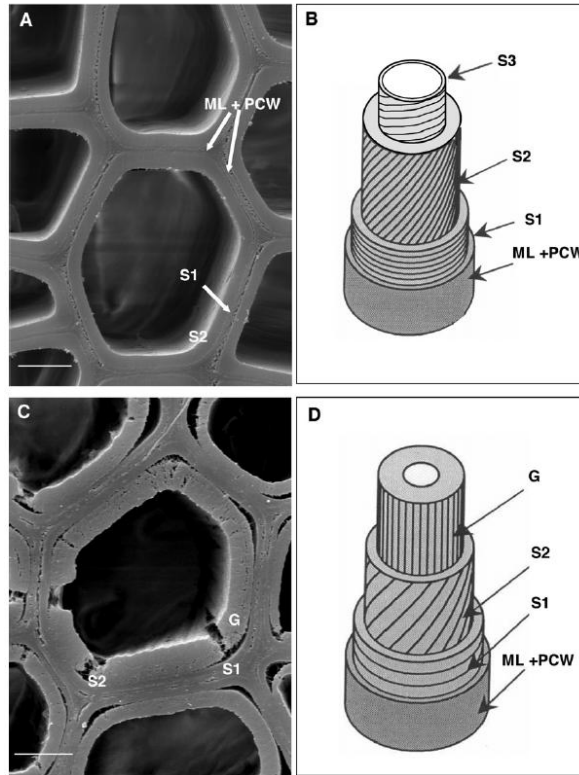


Figure 9 : Organisation de la paroi secondaire de cellules xylémiennes différenciées dans un bois normal et un bois de tension de peuplier (Déjardin *et al.*, 2010).

Photographies de microscopie électronique à balayage (A-C) et schémas représentatifs (B-D) de bois normal (A-B) et de bois de tension (C-D). Les lignes indique l'orientation des microfibrilles de cellulose des différentes couches.

ML : Lamelle Moyenne ; PCW : Paroi primaire ; S1, S2, S3 : couches de la paroi secondaire ; G : couche Gélatineuse. Bar d'échelle : 5 µm.

(2005) ont mis en évidence chez le riz un potentiel osmotique transitoirement diminué du côté gravistimulé (face inférieure). De plus, la courbure gravitropique est empêchée par des inhibiteurs connus des aquaporines. D'après ces auteurs, la stimulation gravitationnelle affecterait l'influx d'eau *via* les aquaporines, conduisant ainsi à la courbure de l'organe. En ce qui concerne la croissance secondaire, des études sur la formation du bois normal mettent en évidence une sur-expression des aquaporines PIPs chez l'eucalyptus et le peuplier, même si leurs rôles ne sont pas définis actuellement (Paux *et al.*, 2004 ; Hacke *et al.*, 2010). Les études conduites chez le robinier montrent que cette sur-expression est localisée au niveau de l'écorce, du cambium et de la zone de transition entre le cambium et le xylème (Yang *et al.*, 2003). Récemment, des travaux réalisés au sein de l'UMR PIAF (Azri, 2009) mettent aussi en avant une augmentation de la quantité des transcrits PIPs dans la partie basale de la tige lors d'une inclinaison de 35° pendant 45 min.

2.5. Objectifs de l'étude

La formation du bois de tension permet à l'arbre de se redresser lorsque celui-ci a été incliné (Moulia et Fournier, 2009). Le bois de tension, qui se forme préférentiellement sur la face supérieure de la tige (Jourez, 1997a), résulte d'une maturation différentielle des cellules issues du cambium entre les deux faces du tronc de l'arbre (Telwski, 2006). Les aquaporines PIPs semblent impliquées dans la formation du bois normal (Yang *et al.*, 2003 ; Paux *et al.*, 2004). Ces protéines sont des canaux qui facilitent le passage de l'eau à travers la membrane plasmique (Maurel *et al.*, 2008). Nous émettons l'hypothèse que les aquaporines PIPs seraient impliquées dans la formation du bois de tension en régulant différentiellement les flux d'eau entre les deux côtés de la tige après gravistimulation, ce qui conduirait à des processus de maturation contrastés.

L'objectif de mon stage de Master recherche 2^{ème} année au sein de l'UMR PIAF 547 est de caractériser l'implication des aquaporines PIPs dans la réponse gravitropique chez le peuplier. Pour répondre à notre hypothèse de travail, le stage a été organisé en trois parties :

- (i) Mesure de flux d'eau entre les faces supérieure et inférieure de la tige de peuplier *Populus tremula x alba* lors d'une sollicitation gravitropique,
- (ii) Suivi d'expression après stimulus gravitropique des aquaporines PIPs du peuplier *Populus tremula x alba*,
- (iii) Localisation dans la tige après stimulus gravitropique des ARNm et des protéines PIPs du peuplier *Populus tremula x alba*.

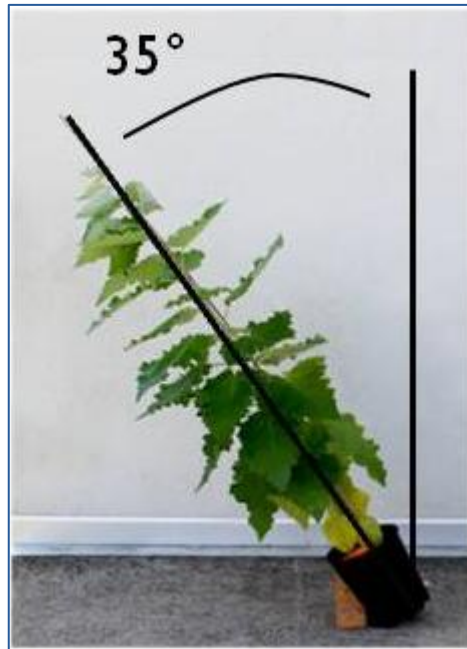


Photo 1: Dispositif d'une contrainte gravitropique. La cale en bois permet une inclinaison de 35° de l'arbre (Source: INRA UMR PIAF, Clermont Ferrand).



Photo 2: Mise en place de capteurs hygromètres sur le bas de tige d'un peuplier.

Un capteur est mis en place sur la face supérieure et sur la face inférieure à la base de la tige. Les capteurs sont directement en contact avec le xylème de l'arbre. (Source : INRA UMR PIAF, Clermont-Ferrand).

3. Travail expérimental

3.1. Matériel végétal

Les arbres utilisés sont des clones de peuplier hybride *Populus tremula x alba* (Pta), clone INRA '717-1B4', multipliés par culture *in vitro* (CIV) sur milieu Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962). Les plantules générées ont été acclimatées en mini serre (photopériode de 16 h jour/8 h nuit – luminosité de 60 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ – température de 22°C jour /19°C nuit – humidité relative d'environ 80%). Elles ont été conditionnées dans des pots de 7*7*6.2 cm contenant un terreau Monagri semis/rempotage n°4 autoclavé. Après 4 semaines de développement, les plants ont été repotés en pots de 2L dans un mélange de terreaux (50% Monagri® NF U 44-551, 50% Humustar Pépinière, Champeix, France). Un second repotage a lieu un mois après dans des pots de 10L avec un mélange de 33% de tourbe noire et 66% de terre végétale de Crouël. Les conditions de cultures sont restées inchangées. L'arrosage a été effectué grâce à un système de gouttes à gouttes.

3.2. Mise en place des contraintes gravitropiques et prélèvements

Les plants présentant environ 50 feuilles et atteignant 140 cm de hauteur ont été utilisés pour les stimulations gravitropiques. Ils ont été tutorés 2 semaines avant le début des expériences.

Les stimulations gravitropiques ont été réalisées en inclinant les pots de 35° par rapport à l'axe vertical. Cet angle permet une réponse gravitropique des tiges en évitant tout développement de branches latérales (*cf.* Photo 1). Différents temps d'inclinaison ont été testés : 0 min (témoin), 30 min, 1 heure et 2 heures. Les réponses de ces plants ont été comparées à celles des plants témoins non inclinés. La partie basale des tiges (entrenœuds 1 à 5) a été collectée. Ces fragments de tige ont été coupés dans le sens longitudinal de manière à séparer les parties supérieure et inférieure. Pour les analyses impliquant l'extraction des ARN totaux, l'écorce et le xylème ont été séparés manuellement pour chaque demi-tige.

Pour chaque temps expérimental (0, 30 min, 1h et 2h), les prélèvements ont été réalisés sur 3 arbres différents.

3.3. Mesure du potentiel hydrique de la partie basale de la tige

Seuls les peupliers présentant une tige d'un diamètre minimum de 15 mm ont été sélectionnés pour cette expérience. Des capteurs thermocouples (PWS instrumentation Inc., Guelph, Ontario, Canada) reliés à un psychromètre HR-33T en mode Dew Point (Wescor, Logan, USA) ont été placés contre la tige du peuplier au niveau de la zone basale (15 cm de hauteur) où l'écorce a été enlevée, c'est-à-dire en contact avec le xylème (*cf.* Photo 2). Les

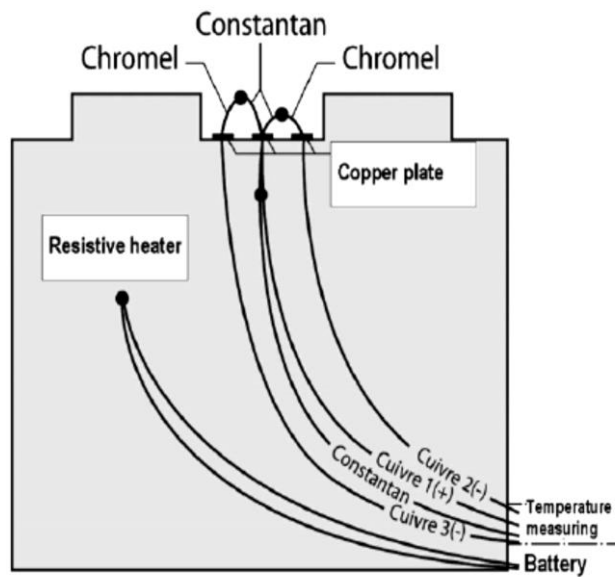


Figure 10 : Schéma de coupe longitudinale d'un capteur-hygromètre de tige (Nizinski *et al*, 2013).

Battery : batterie

Copper plate : plaque de cuivre

Resistive heater : résistance chauffante

thermocouples sont dans une chambre poreuse (cf. Figure 10). L'isolement de la chambre par rapport à l'environnement extérieur a été assuré par un joint de silicone. Le principe de la mesure est le suivant. Un équilibre se crée entre l'humidité relative de la chambre et celle du xylème. Le psychromètre permet de mesurer l'humidité relative de la chambre, et donc du xylème. Cette mesure repose sur l'effet Peltier qu'est l'effet thermoélectrique qui conduit à un refroidissement de la soudure entre deux métaux lorsqu'un courant la traverse. Ainsi, l'humidité relative de la chambre est connue en mesurant avec un thermocouple couplé à un voltmètre, la différence de tension engendrée par l'écart de température entre une soudure de référence, à la température du milieu, et une soudure de mesure à la température d'un film d'eau maintenu au point de rosée (point de condensation). La température de condensation de l'eau correspond indirectement à l'humidité relative de la chambre. La condensation de l'eau sur la soudure de mesure est obtenue en refroidissant cette soudure par effet Peltier. En conséquence, plus le tissu est sec, plus la différence de tension délivrée pour refroidir la chambre afin d'atteindre le point de condensation est importante.

L'humidité relative de la chambre est liée au potentiel hydrique de l'eau du xylème par la loi de Kelvin :

$$\varphi_x = \frac{RT}{V_{eau}} \ln \frac{\rho}{\rho_{(T)}}$$

avec φ_x : potentiel hydrique du xylème (Pa), R : constante des gaz parfaits ($8.31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T : température de l'air (K), V_{eau} : volume molaire de l'eau ($18 \times 10^{-6} \text{ m}^3.\text{mol}^{-1}$), ρ : pression partielle de vapeur à la température T (Pa) et $\rho_{(T)}$: pression de vapeur saturée à la température T (Pa).

Pour chacune des trois répétitions biologiques, un arbre témoin et un arbre incliné ont été traités en même temps. Pour la Figure 13, la valeur de potentiel hydrique au $t=0$, soit immédiatement après l'inclinaison de la tige, a été retranchée de toutes les valeurs brutes, de manière à avoir une valeur 0 au $t=0$ pour toutes les expériences. Les moyennes et les erreurs standards des valeurs corrigées pour chaque pas de temps de la cinétique ont été calculées. Une analyse de variance a été réalisée à l'aide Statgraphics Plus 5.1. Pour la Figure 14, les différences entre les moyennes corrigées obtenues pour les faces supérieure et inférieure de la tige ont été calculées.

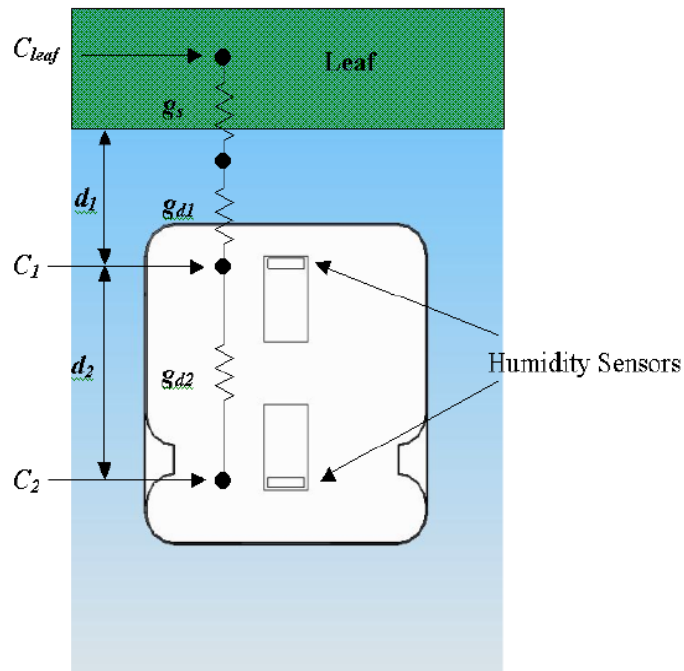


Figure 11: Principe de mesure du Leaf Porometer SC-1 (Decagon Devices Inc., Pullman, USA) (Source : Leaf Porometer Operator's Manual).

Humidity sensors : capteurs d'humidité

C_{leaf} : Concentration de l'eau à l'intérieur de la feuille

C_1 : Concentration de l'eau du capteur 1

C_2 : Concentration de l'eau du capteur 2

g_s : Conductance stomatique de la feuille

g_{d1} : Conductance entre la feuille et le capteur 1

g_{d2} : Conductance entre les capteurs 1 et 2

d_1 : Distance entre la feuille et le capteur 1

d_2 : Distance entre les capteurs 1 et 2

3.4. Mesure de la conductance stomatique et de la transpiration foliaire

La conductance stomatique a été mesurée à l'aide de l'appareil Leaf Porometer SC-1 (Decagon Devices Inc., Pullman, USA). Par définition, la conductance stomatique (g_s) est la mesure du flux de vapeur d'eau à travers les stomates de la feuille. Le poromètre est constitué de deux capteurs de conductance (*cf.* Figure 11, capteurs C1 et C2). La différence de degré d'humidité entre ces deux capteurs permet de déterminer le flux d'eau ($\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Les mesures de conductance stomatique ont été prises simultanément aux mesures de potentiel hydrique de tige. Pour chaque arbre, une feuille de chaque côté de la tige (inférieur et supérieur) et entre 1,50 et 1,70 m de hauteur a été suivie durant toute la cinétique. Pour les Figures 15 et 16, les moyennes et les erreurs standards ont été calculées. Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA grâce au programme Statgraphics Plus 5.1.

3.5. Extraction des ARN totaux, Synthèse des ADNc

Les ARNs totaux (ARNtx) de l'écorce et du xylème de chaque demi-tige ont été extraits à partir de 150 mg de broyat de tissus végétal en utilisant un tampon CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) selon Chang *et al.* (1993). La détermination de la concentration et de la qualité des ARNtx a été obtenue par dosage spectrophotométrique aux longueurs d'onde 230, 260 et 280 nm grâce à un Nanodrop ND-1000 (Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, Ma, USA). Un dépôt d'1 μg d'ARNtx sur un gel TAE 0.5X – agarose 1.5 % a permis aussi d'apprécier visuellement la qualité de ces derniers.

Un μg d'ARNtx a été utilisé pour la synthèse des ADN complémentaires simple brin (ADNc) à l'aide du kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les ADNc ont été dilués au 40^{ème} puis stockés à -80°C.

3.6. PCR quantitative en temps réel

L'amplification des ADNc par PCR a été obtenue à l'aide du thermocycleur iCycleur iQ (BioRad, Hercules, CA, USA) dans un volume réactionnel final de 15 μL contenant : 2 μL d'ADNc dilués au 40^{ème} et 13 μL d'un mélange comprenant du MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgique) à la concentration 1X, 10 μM des couples d'amorces du gène d'intérêt et complété avec de l'eau ultra pure stérile. L'efficacité des amplifications (E) a été appréciée au cours d'une PCR sur une dilution d'ADNc présentant une gamme de dilution au demi allant du 20^{ème} au 160^{ème}. Les PCR en temps réel ont commencé par une dénaturation de 3 min à 94°C suivie de 35 cycles de 10 sec à 94°C, 10 sec au T_m du couple d'amorces utilisé (*cf.* Tableau 1) et 15 sec à 72°C. Une dissociation des produits PCR a été réalisée pendant 1 min à 95°C.

Tableau 1: Liste des amorces utilisées pour les PCR quantitatives en temps réel
A : Adénine, G : Guanine, T : Thymine, C : Cytosine.

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Tm (°C)	Taille (pb)
PtaPIP1.1	CAAGAAGTGATGAYTGTGATGC	ACGTCACGTGTATAGCACGC	54	124
PtaPIP1.2	TTCAAGAGCAGAGCTTAATTC	TTCAAAAAGCTAGATAATTTACAC		155
PtaPIP1.3	AAGAAGTGATTATTATGATTATGG	GATTGAAGAAACACGTATTGCTA		169
PtaPIP1.4	GACAGAAAACAAGGTTCTTTAGA	GAGTAATTTACATAAATGGAACC		179
PtaPIP1.5	TCGTTCCCAATCRATGGATGTT	AAGAATTCACGTGAGAGGGAATA		156
PtaPIP2.1	TGCTAACATGGTGGCTCCC	GATCATCCCAGGCTTTCTTATC	57	272
PtaPIP2.2	TGGTACACTTGGCCACAATC	GCTAATGCTCCCAAAATGG		142
PtaPIP2.3	ATTCAGTTATGGAACGTACGC	AGCTCACAACCATGACATAAC		118
PtaPIP2.4	CCAACGGTTTTAAATCTCGGTTC	ACCGAAAGGGATAATAAAGGG		105
PtaPIP2.5	TGTGTACATTATGGTGTCGTG	CAAAGAAGCAGCACTACCTGAGAC		119
PtaPIP2.6	ATCCAATCACAGGAACTGG	CTATGGCTGCACCAATGAAG		117
PtaPIP2.7	ATGACCATTGGCTCTTCTGG	GGCTTTAAGCATTGCTCCTG		126
PtaPIP2.8	GCAATCCTACTAGCTAAGGC	ACCCACATATCAAGTTGAGAC		127
PtaPIP2.9	ACTGGAAGTGGCATCAATCC	CCAACCCAGAAAATCCACAG		98
PtaPIP2.10	CACAGTCGTGGTCAAGATGTC	ACTAGTTGATTATGAGATAGGGAG		126
UBQ	GGGTCCAGCTTCTTGCACTC	CCCGGCTCTAACCATATCCA	60	146
EF1 α	GACAACCTAGGTACTACTGCACTGT	TTGGTGGACCTCTCGATCATG		378

Enfin, une courbe de fusion a été obtenue de 57°C à 90°C par intervalle de 0.5°C toutes les 10 sec. Cette courbe permet de s'assurer du bon déroulement de la réaction d'amplification PCR et de la spécificité des amorces pour le gène d'intérêt.

Les niveaux d'expression des transcrits des différents gènes *PIP* ont été estimés après 30 min, 1 h et 2 h d'une stimulation gravitropique. Dans un premier temps, les cycles seuils (Cq) bruts ont été normalisés par 3 gènes de référence (*PtaUP2*, *PtaUBQ* et *PtaEF1-α*) à l'aide de l'outil BestKeeper (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html> ; Pfaffl *et al.*, 2004). Les niveaux d'expression de chaque échantillon ont été calculés en utilisant la méthode $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak et Shmittgen, 2001). Enfin, les données obtenues à l'issue de 3 répétitions biologiques ont été analysées à l'aide d'une ANOVA, suivie d'un test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($\alpha=5\%$) grâce au programme Statgraphics Plus 5.1.

3.7. Préparation du matériel végétal en vue d'une hybridation *in situ* ou d'une immunolocalisation *in situ*

3.7.1. Inclusion en paraffine

Les parties supérieure et inférieure prélevées ont été recoupées en fragments d'environ 4 à 5 mm de longueur (*cf.* Figure 12). Le matériel a été inclus dans la paraffine suivant le protocole décrit par Brunel *et al.* (2002).

3.7.2. Obtention et préparation des coupes histologiques

Les coupes histologiques d'une épaisseur de 10 µm ont été obtenues grâce à un microtome Microm HM 340E (Thermo Scientific). Elles ont été déposées sur des lames SuperFrost® Plus (Fisher Scientific, Elancourt, France) et placées à 42°C pendant 24h pour séchage. Les étapes de déparaffinage et de réhydratation sont détaillées par Brunel *et al.* (2002).

3.8. Hybridation *in situ*

3.8.1. Préparation des sondes ARN

Les sondes ARN ont été choisies de façon à être spécifiques des régions 3' UTR des transcrits de *PtaPIP-1;3* et *PtaPIP-2;4*. Leurs tailles sont respectivement de 208 et 215 pb (*cf.* Tableau 2). Elles ont été clonées dans le plasmide pGEM T-Easy® (Promega, Madison, WI, USA). Un kit de transcription *in vitro* (Promega) en présence de DIG-UTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) permet la synthèse des sondes ARN sens et antisens à partir des sites SP6 et T7 du plasmide.

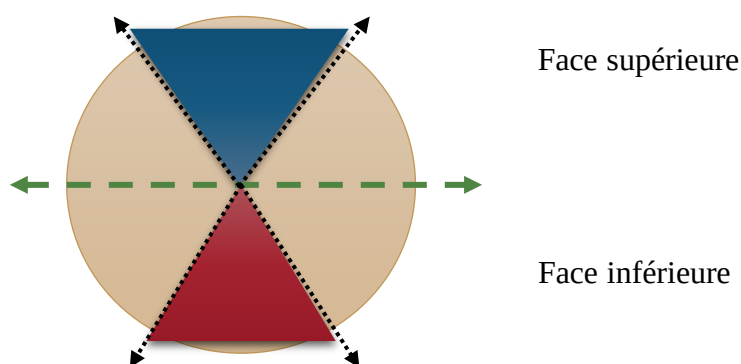


Figure 12: Schéma de découpe de la tige (coupe transversale, marron).

Le triangle bleu représente la partie gardée de la face supérieure, le triangle rouge celle de la face inférieure en vue d’une inclusion en paraffine.

Tableau 2: Amorces utilisées pour la synthèse des sondes ARN en hybridation *in situ*.
A : Adénine, G : Guanine, T : Thymine, C : Cytosine.

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Taille (pb)
PtaPIP1.3	AAGAAGTGATTATTATGATTATGG	CTATTATTACATTACATGTG CAATTGGG	208
PtaPIP2.4	TGAAGAAGTGCTTGCTGCTCCAG	GCTTTACTTAGAAGCACAAT AGGTGC	215

3.8.2. Hybridation, révélation et observations

Les coupes ont été pré-traitées de façon à augmenter l'accessibilité des ARNm à la sonde (traitement à la protéinase K à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et à diminuer les hybridations aspécifiques (traitement au tampon Triethanolamine 0.1M pH8 - anhydride acétique 0.5% (v/v)) selon le protocole décrit par Dusotoit-Coucaud *et al.* (2009). Une concentration finale de 1.5 ng de sondes ARN par μL de tampon d'hybridation a été respectée lors de l'étape d'hybridation. L'immunodétection de la sonde-DIG, grâce à un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostic), a été réalisée selon Poupard *et al.* (2001). La révélation a été obtenue à l'aide du kit « Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit » (Biorad) pendant une nuit à température ambiante. La réaction de coloration a été stoppée avec de l'eau ultra pure. Les coupes ont été montées entre lames et lamelles dans de la résine Eukitt® (Euromedex, Mündelsheim, France). Les lames ont été observées et photographiées grâce à un microscope Axioplan 2 (Zeiss) couplé à une caméra digitale (AxioCam HR, Zeiss) et au logiciel AxioVision Rel 4.8 (Zeiss).

3.9. Immunolocalisation *in situ*

3.9.1. Préparation des anticorps anti-PIP (anticorps primaires)

Les anticorps anti-PIP utilisés présentent une affinité générale pour les protéines PIP de type 1 (GKEEDVRGANKFPERQPIGTSA, AS09487, Agrisera, Vännäs, Sweden) ou pour les protéines PIP de type 2 (AKDIEASGPEAGEFS AKD, fournis par François Chaumont, Université Catholique de Louvain, Belgique). Les anticorps ont été reçus lyophilisés. Leur utilisation a requis une réhydratation dans de l'eau ultra pure puis une dilution au $1000^{\text{ème}}$ (protéines PIP de type 1) ou au $500^{\text{ème}}$ (protéines PIP de type 2) dans du tampon de saturation (PBS 1X – Triton X-100 0.1% (v/v)- Tween 20 0.2% (v/v)- BSA 0.1% (p/v)- NGS 5% (v/v)).

3.9.2. Réaction, révélation et observations

L'immunolocalisation *in situ* a été réalisée selon le protocole décrit par Dusotoit-Coucaud *et al.* (2010). En résumé, les coupes ont été soumises à une saturation des sites non spécifiques avant la réaction avec l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire a été dilué au $40^{\text{ème}}$ (Goat Anti-Rabbit, Sigma) et couplé à la phosphatase alcaline. La révélation du marquage et l'observation des coupes ont été réalisées comme indiqué dans le paragraphe 4.2.

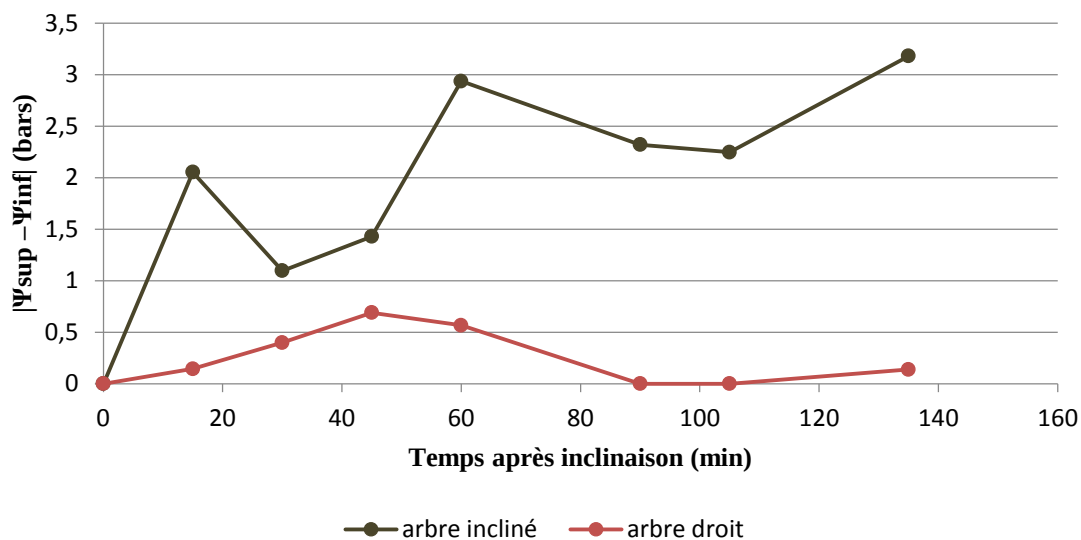


Figure 13: Différence en valeur absolue de la moyenne de potentiels hydriques (en bars) entre les faces supérieure (Ψ_{sup}) et inférieure (Ψ_{inf}) de la tige d'arbres droit (courbe rouge) et inclinés à 35° (courbe noire).

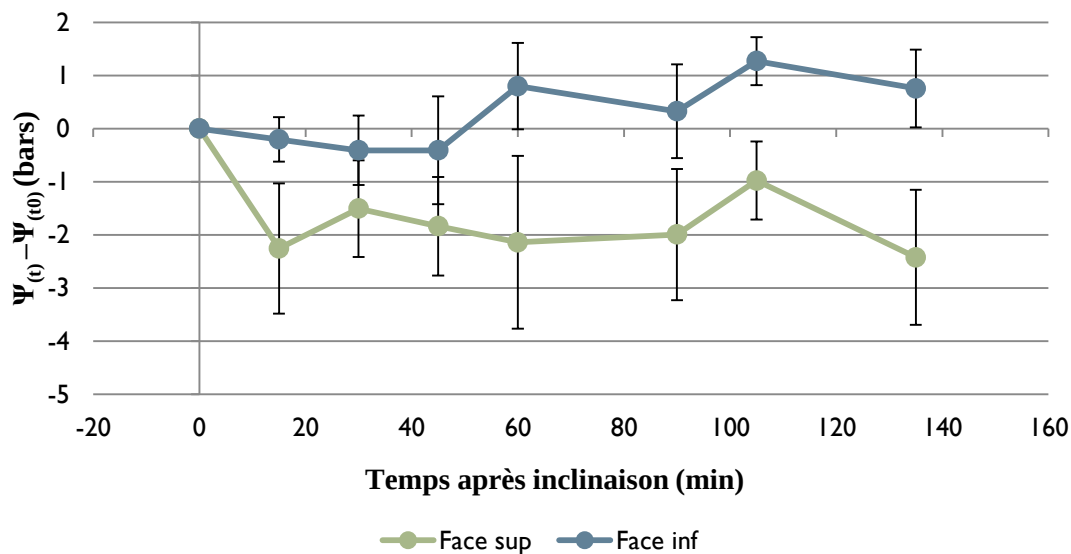


Figure 14: Potentiels hydriques corrigés par rapport au temps $t = 0$ ($\Psi_{(t)} - \Psi_{(t0)}$) (en bars) des faces supérieure (courbe verte) et inférieure de tige (courbe bleue) d'arbres inclinés à 35° . Les moyennes et les erreurs standards de 3 répétitions biologiques sont présentées.

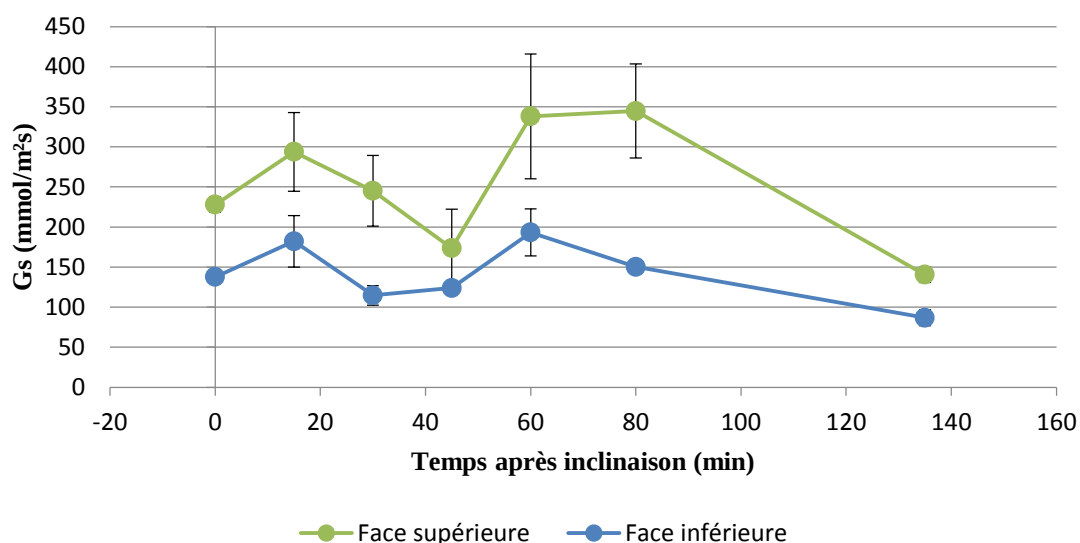


Figure 15: Conductance stomatique (g_s) de la face supérieure (courbe verte) et de la face inférieure (courbe bleue) en condition « témoin non incliné ». Les moyennes et les erreurs standards de 3 répétitions biologiques sont représentées.

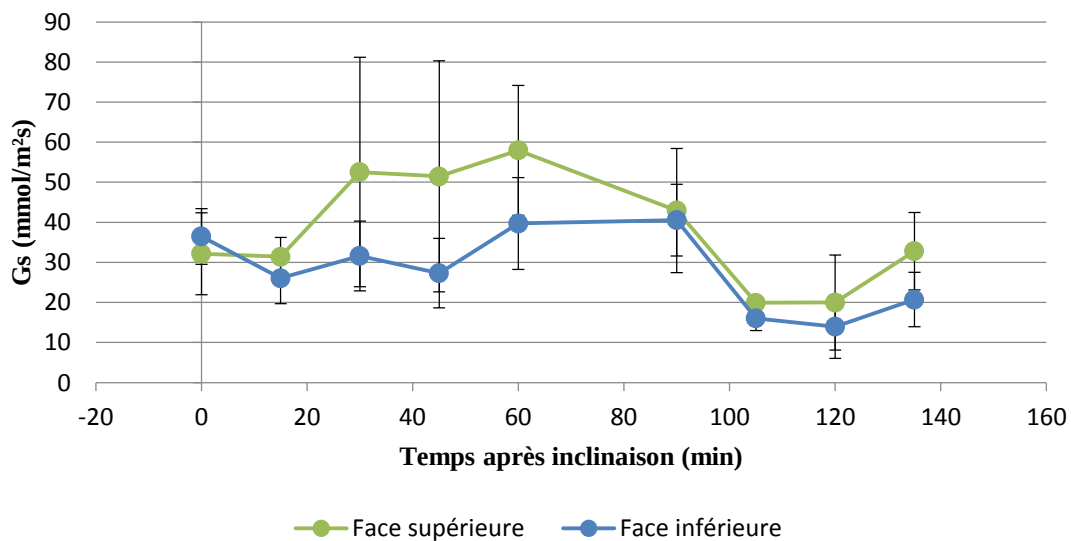


Figure 16 : Conductance stomatique (g_s) de la face supérieure (courbe verte) et de la face inférieure (courbe bleue) en condition « incliné à 35° ». Les moyennes et les erreurs standards de 3 répétitions biologiques sont représentées.

4. Résultats

4.1. Mesure de potentiel hydrique dans la partie basale de la tige

Les capteurs psychromètre placés sur la partie basale de la tige du peuplier ont permis d'enregistrer des valeurs de potentiel hydrique de part et d'autre de l'axe de la tige. La Figure 13 permet de visualiser l'évolution des différences de potentiel hydriques entre les faces supérieure et inférieure de la tige. Cette différence reste stable pour la condition « plant non incliné ». Par contre cette différence augmente avec le temps pour la condition traitée « plant incliné à 35° ». En effet, dès 15 min, il est observé une différence de 2,05 bars. Un second pic à 2,9 bars est ensuite observé à 60 min. Au bout de 2 h d'inclinaison, la différence de potentiel hydrique les deux faces de la tige est de 3,20 bars.

La Figure 14 permet d'appréhender, de manière indirecte puisque les valeurs traitées sont des différences, l'évolution des potentiels hydriques entre les faces supérieure et inférieure après inclinaison. Bien que les erreurs standards reportées sur la Figure 14 soient importantes, l'analyse de variance nous indique qu'il existe une différence significative entre les moyennes des potentiels hydriques des deux côtés de la tige (P -value = 0,0036). L'inclinaison de la tige semble modifier différenciellement les potentiels hydriques de chaque côté du bas de la tige. Après inclinaison, le potentiel hydrique de la face supérieure de la tige devient plus négatif, contrairement à celui de la face inférieure.

4.2. Conductance stomatique

En parallèle des mesures de potentiel hydrique dans la partie basale de la tige, la conductance stomatique d'une feuille par côté de la tige a été suivie. La Figure 15 présente les moyennes des conductances stomatiques obtenues pour chaque côté de la tige de la condition « témoin non incliné ». L'analyse de variance nous indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux faces de la tige pour les valeurs de conductance (P -value = 0,0464). Pour la condition traitée par inclinaison à 35°, les moyennes des conductances stomatiques sont rapportées sur la Figure 16. Le test ANOVA ne rapporte pas de différence significative entre les faces supérieure et inférieure de la tige inclinée à 35° (P -value = 0,9493). Les figures 15 et 16 nous montrent que les valeurs de conductance foliaire sont globalement plus importantes pour les plants témoins que pour les plants inclinés. En effet, dans la première condition, les moyennes de conductances foliaires sont situées entre 100 et 350 mmol.m⁻².s⁻¹. Dans la seconde condition, elles se situent entre 10 et 60 mmol.m⁻².s⁻¹ et ce, alors que les arbres témoins et inclinés ont toujours été traités deux par deux et 3 répétitions biologiques ont ainsi été réalisées.

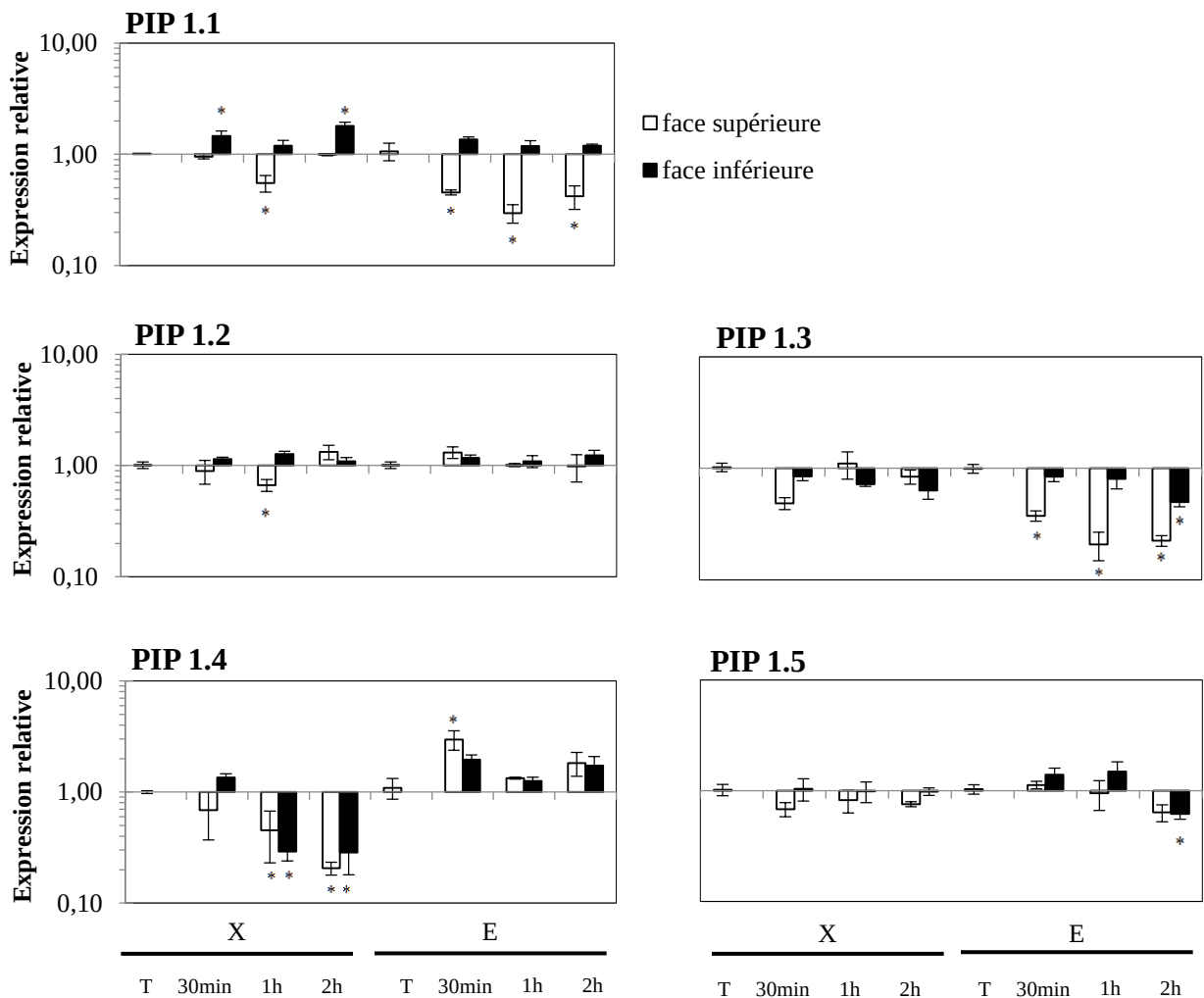


Figure 17 : Expression relative de 5 *PtaPIP1* chez *Populus tremula x alba* après une sollicitation gravitropique.

Les plantes ont été inclinées à 35° pendant 30 min, 1 h ou 2 h. Les demi-tiges supérieure (blanc) de la tige inférieure (noir) ont été séparées. Pour chaque partie, le xylème (X) et l'écorce (E) ont été individualisés. L'expression relative des 5 *PtaPIP1* a été calculée en fonction de l'expression dans les plantes non inclinées, d'après la formule $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$. Les moyennes et les erreurs standards de 3 répétitions biologiques sont présentées. Les données du xylème et de l'écorce sont analysées séparément à l'aide d'une ANOVA suivie d'un test LSD de Fisher ($\alpha = 5\%$). Les niveaux d'expression significativement différents du témoin dans le xylème ou dans l'écorce sont indiqués par le symbole '*'.

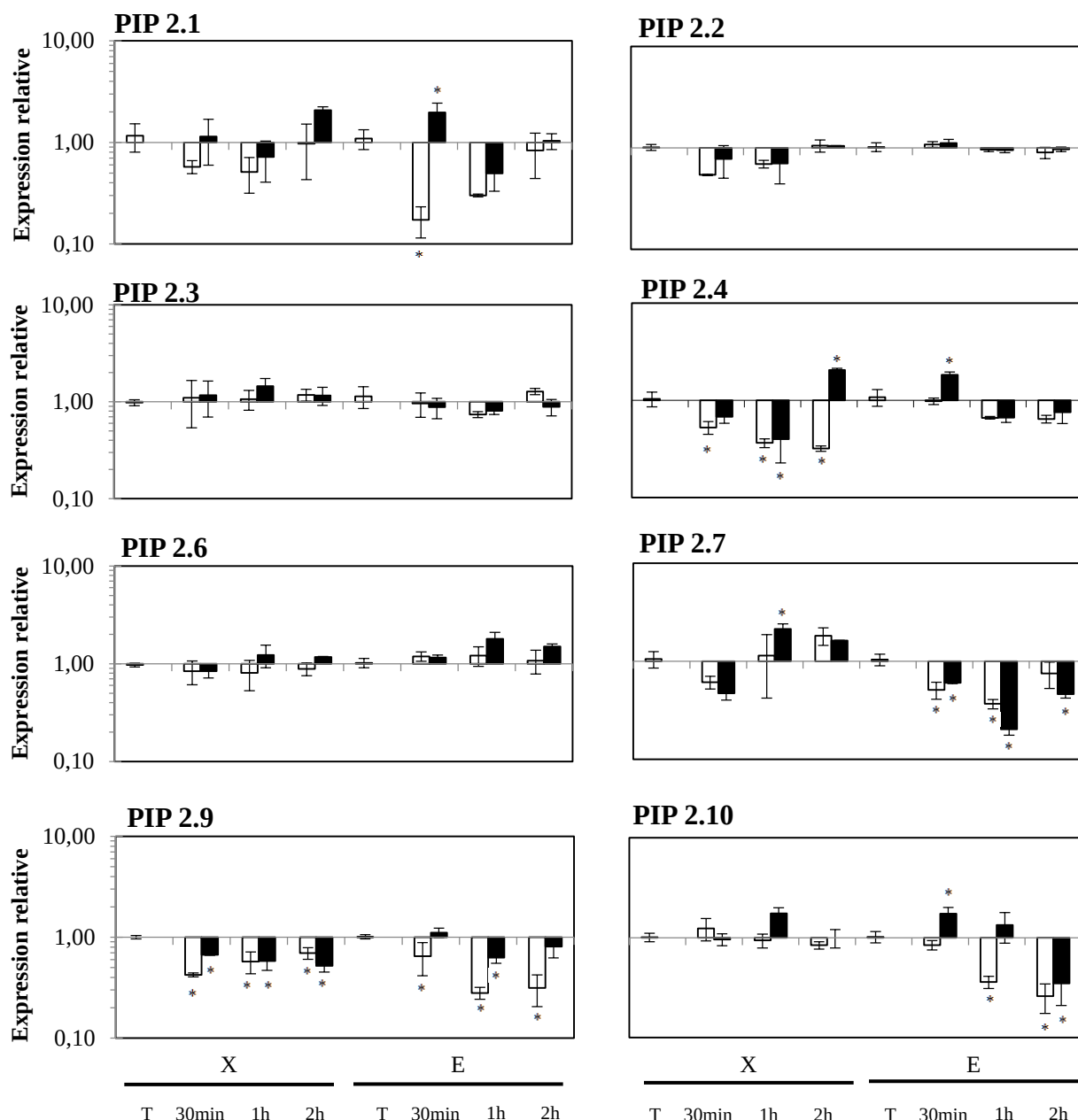


Figure 18 : Expression relative de 8 *PtaPIP2* chez *Populus tremula x alba* après une sollicitation gravitropique.

Les plantes ont été inclinées à 35° pendant 30 min, 1 h ou 2 h. Les demi-tiges supérieure (blanc) de la tige inférieure (noir) ont été séparées. Pour chaque partie, le xylème (X) et l'écorce (E) ont été individualisés. L'expression relative des 8 *PtaPIP2* a été calculée en fonction de l'expression dans les plantes non inclinées, d'après la formule $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$. Les moyennes et les erreurs standards de 3 répétitions biologiques sont présentées. Les données du xylème et de l'écorce sont analysées séparément à l'aide d'une ANOVA suivie d'un test LSD de Fisher ($\alpha = 5\%$). Les niveaux d'expression significativement différents du témoin dans le xylème ou dans l'écorce sont indiqués par le symbole '*'.

4.3. PCR quantitative

La Figure 17 représente la quantité relative de transcrits de 5 isoformes *PtaPIP1* par rapport aux arbres témoins dans le xylème et l'écorce des demi-tiges supérieure et inférieure après 30 min, 1 h et 2 h d'inclinaison à 35°. Les différences significatives d'expression par rapport à la condition « témoin non incliné » sont repérées par des '*' (seuil à 5%)

D'une manière globale, il n'est pas observé de profil d'expression consensus entre les *PtaPIP1* dans le xylème. Des modulations d'expression significativement contrastées sont observées dans le xylème de part et d'autre de la tige (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP1.2* et *PtaPIP1.4*). D'une manière plus détaillée, *PtaPIP1.1* est induit du côté inférieur après 30 min et 2 h de sollicitation. De plus, *PtaPIP1.1* et *PtaPIP1.2* sont réprimés dans la face supérieure de la tige après 1 h d'inclinaison. *PtaPIP1.4* est fortement réprimé de part et d'autre du xylème 1 h et 2 h après inclinaison.

En ce qui concerne l'écorce, la face supérieure de la tige présente, en plus d'une sous expression maintenue de *PtaPIP1.1* et *PtaPIP1.3* après inclinaison, une sur-expression transitoire (à 30 min) de *PtaPIP1.4*. L'expression de *PtaPIP1.3* et de *PtaPIP1.5* est également réprimée pour la face inférieure de la tige 2h après inclinaison.

La quantité relative de transcrits de 8 isoformes *PtaPIP2* a aussi été calculée dans le xylème et l'écorce des demi-tiges supérieure et inférieure après 30 min, 1 h et 2 h d'inclinaison à 35° (cf. Figure 18). Dans l'ensemble, comme pour les *PtaPIP1*, les patterns d'expression observés sont contrastés. Les expressions de *PtaPIP2.2*, *PtaPIP2.3* et *PtaPIP2.6* ne sont pas modulées par l'inclinaison de la tige, quels que soient le tissu considéré et la durée de l'inclinaison. Les *PtaPIP2.4*, *PtaPIP2.7* et *PtaPIP2.9* montrent des modulations de leur expression dans le xylème tandis que *PtaPIP2.1*, *PtaPIP2.4*, *PtaPIP2.7* et *PtaPIP2.10* sont différentiellement exprimés dans l'écorce.

Plus précisément, *PtaPIP2.4* et *PtaPIP2.9* sont réprimés dans le xylème côté inférieur et ce, pour chaque temps d'inclinaison. Alors que *PtaPIP2.4* est sous-exprimé dans le xylème, côté inférieur de la tige après 1 h d'inclinaison puis sur-exprimé après 2 h, *PtaPIP2.9* est réprimé pour chaque temps. De plus, l'expression de *PtaPIP2.7* est induite dans le xylème, côté inférieur.

En ce qui concerne l'écorce, face supérieure de la tige, l'expression de *PtaPIP2.1* est réprimée significativement après 30 min d'inclinaison, celle de *PtaPIP2.7* après 30 min et 1 h d'inclinaison et celle de *PtaPIP2.10* après 1 h et 2 h d'inclinaison. De plus, *PtaPIP2.9* est réprimé quel que soit le temps d'inclinaison. Pour l'écorce, côté inférieur de la tige,

Tableau 3 : Récapitulatif des différentiels d’expression relative des *PtaPIP* entre les faces supérieure et inférieure chez *Populus tremula x alba* après une sollicitation gravitropique.

Les analyses reportées dans ce tableau sont différentes des Figures 17 et 18 . Les données du xylème et de l’écorce sont analysées séparément à l’aide d’un test LSD de Fisher ($\alpha = 5\%$). Les niveaux d’expression significativement différents entre les deux côtés de la tige dans le xylème ou dans l’écorce sont indiqués par le symbole ‘+’.

Temps	30 min		1 h		2 h	
Organe	Xylème	Ecorce	Xylème	Ecorce	Xylème	Ecorce
PtaPIP 1.1	+	+	+	+	+	+
PtaPIP 1.2	-	-	+	-	-	-
PtaPIP 1.3	-	+	-	+	-	+
PtaPIP 1.4	+	-	-	-	-	-
PtaPIP 1.5	-	-	-	-	-	-
PtaPIP 2.1	-	+	-	-	-	-
PtaPIP 2.4	-	+	-	-	+	-
PtaPIP 2.7	-	-	-	-	-	-
PtaPIP 2.9	-	+	-	-	-	+
PtaPIP 2.10	+	-	-	-	-	-

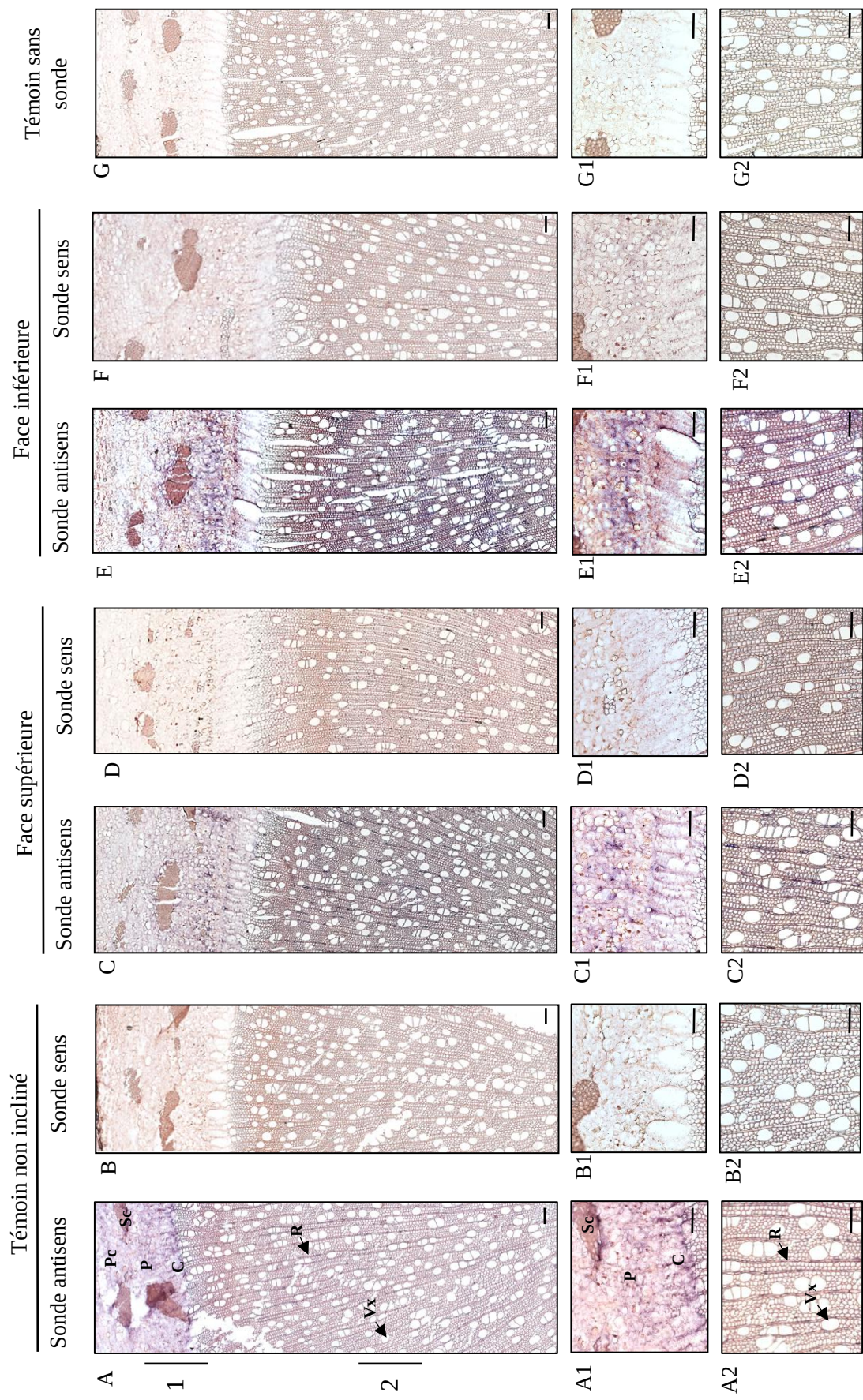


Figure 19 : Hybridation *in situ* de la sonde PtPIP1.3 sur un arbre témoin non incliné (A et B) et sur les faces supérieure (C et D) et inférieure (E et F) d'un arbre incliné à 35° pendant 2 h. Les coupes A, C et E correspondent aux coupes hybridées avec la sonde anti-sens tandis que les coupes B, D et F correspondent aux coupes hybridées avec la sonde sens. Les coupes G sont celles du témoin sans sonde. Les coupes avec numéros (A1 à G2) correspondent au zoom fait sur l'écorce (1) et du xylème (2). Echelle = 100 µm.

Pc : Parenchyme cortical ; P : Phloème ; Sc : Sclérenchyme ; C : Cambium ; R : Rayons ; Vx : Vaisseaux.

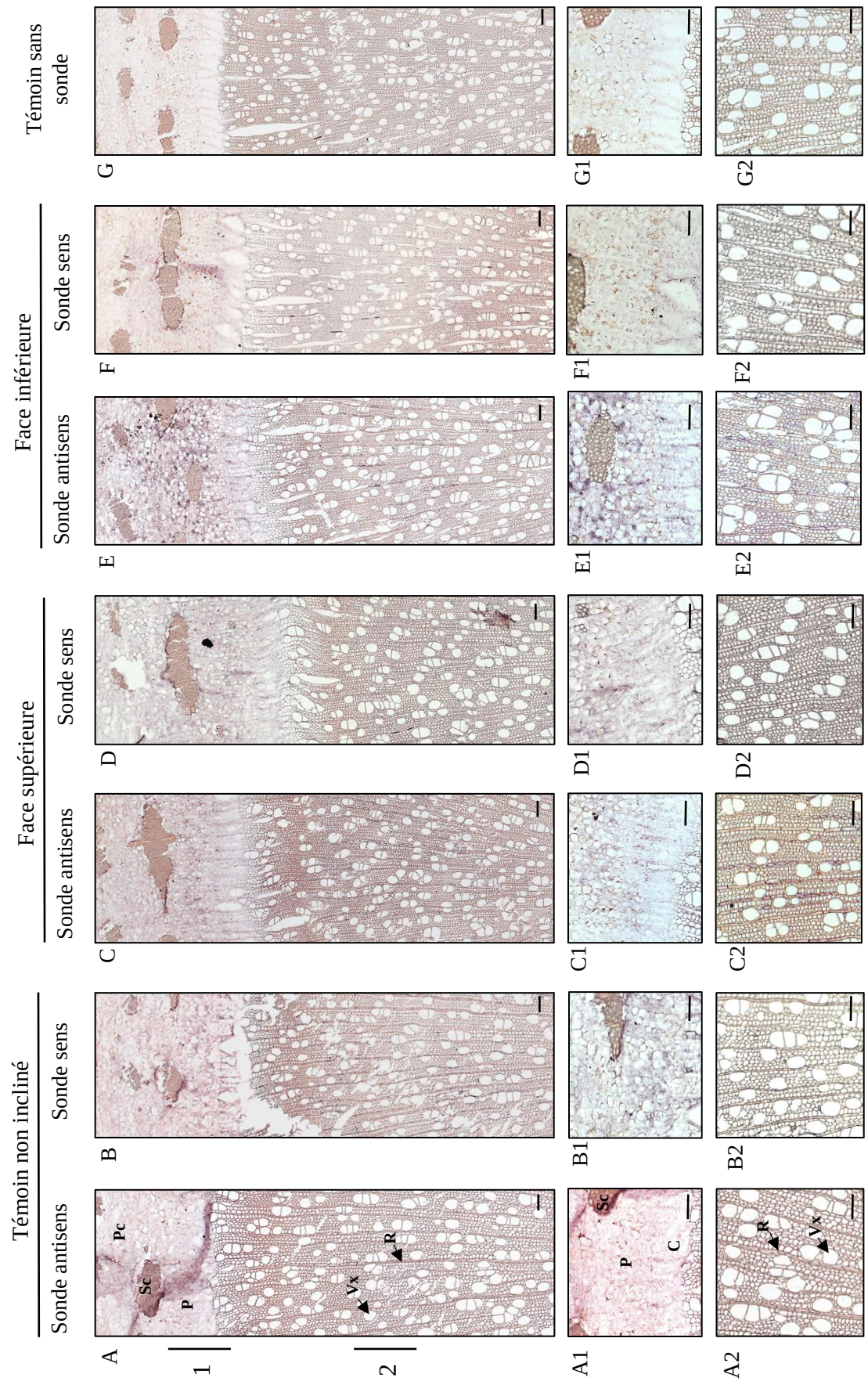


Figure 20 : Hybridation *in situ* de la sonde *PrtPIP2.4* sur un arbre témoin non incliné (A et B) et sur les faces supérieure (C et D) et inférieure (E et F) d'un arbre incliné à 35° pendant 2 h. Les coupes A, C et E correspondent aux coupes hybridées avec la sonde anti-sens tandis que les coupes B, D et F correspondent aux coupes hybridées avec la sonde sens. Les coupes G sont celles du témoin sans sonde. Les coupes avec numéros (A1 à G2) correspondent au zoom fait sur l'écorce (1) et du xylème (2). Echelle = 100 µm.

Pc : Parenchyme cortical ; P : Phloème ; Sc : Sclérénchyme ; C : Cambium ; R : Rayons ; Vx : Vaisseaux.

l'expression de *PtaPIP2.1*, *PtaPIP2.4* et *PtaPIP2.10* augmente après 30 min d'inclinaison. Enfin, l'expression de *PtaPIP2.9* est réprimée 1 h après inclinaison alors que celle de *PtaPIP2.10* après 2 h d'inclinaison et que celle de *PtaPIP2.7* au-delà d'1 h d'inclinaison.

Des tests statistiques (LSD de Fisher) ont aussi permis de mettre en évidence les différences significatives d'expression entre les faces supérieure et inférieure de la tige inclinée (cf. Tableau 3). Dans l'ensemble, seul *PtaPIP1.1* présente des différences significatives d'expressions relatives entre les deux côtés de la tige pour chaque tissu et pour chaque temps. A *contrario*, *PtaPIP1.5* et *PtaPIP2.7* ne présentent pas de différentiel d'expression. De plus, au niveau du xylème, 3 des 10 isoformes sont différentiellement exprimées après 30 min (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP1.4* et *PtaPIP2.10*), 2 après 1 h (*PtaPIP1.1* et *PtaPIP1.2*) et 2 le sont après 2 h d'inclinaison (*PtaPIP1.1* et *PtaPIP2.4*). En ce qui concerne l'écorce, 5 des 10 isoformes analysées sont différentiellement exprimées après 30 min (*PtaPIP1.1* ; *PtaPIP1.3*, *PtaPIP2.1*, *PtaPIP2.4* et *PtaPIP2.9*), 2 isoformes après 1 h (*PtaPIP1.1* et *PtaPIP 1.2*) et 3 le sont après 2 h d'inclinaison (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.9*). Ces résultats orientent notre choix des gènes retenus pour la synthèse des sondes ARN en vue d'une hybridation *in situ* sur des sections de tige. Ainsi des sondes *PtaPIP1.1*, *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.4* seront réalisées.

4.4. Hybridation *in situ*

Les hybridations *in situ* ont été réalisées sur des tiges non inclinées et sur les demi-tiges supérieure et inférieure des arbres inclinés à 35° pendant 2 h. Une première hybridation *in situ* avec la sonde ARN *PtaPIP1.1* s'est révélée non interprétable (travaux non montrés). En effet, des marquages aspécifiques avec la sonde sens ont été observés. Les photos présentées sont représentatives des séries de clichés réalisées sur 3 répétitions biologiques après hybridation avec la sonde ARN *PtaPIP1.3* (cf. Figure 19). Que ce soient en condition non inclinée ou inclinée, le marquage (bleu-violet), révélant la présence de transcrits *PtaPIP1.3*, est localisé au niveau du phloème, du cambium et du jeune xylème (cf. Figures 19 A, C et E). De plus, une coloration est visible au niveau des rayons xylémiens en particulier ceux proches des vaisseaux (cf. Figures 19 A2, C2 et E2). Les coupes hybridées avec la sonde ARN sens et la coupe témoin sans sonde ne présentent pas de marquage, permettant ainsi de valider l'expérimentation (cf. Figures 19 B, D, F et G). En ce qui concerne l'hybridation avec la sonde *PtaPIP2.4*, une légère coloration du phloème est visible dans la tige de l'arbre non incliné (cf. Figure 20 A1). Les faces supérieure et inférieure de la tige inclinée sont colorées au niveau du phloème et des rayons xylémiens proches des vaisseaux. Un léger marquage est

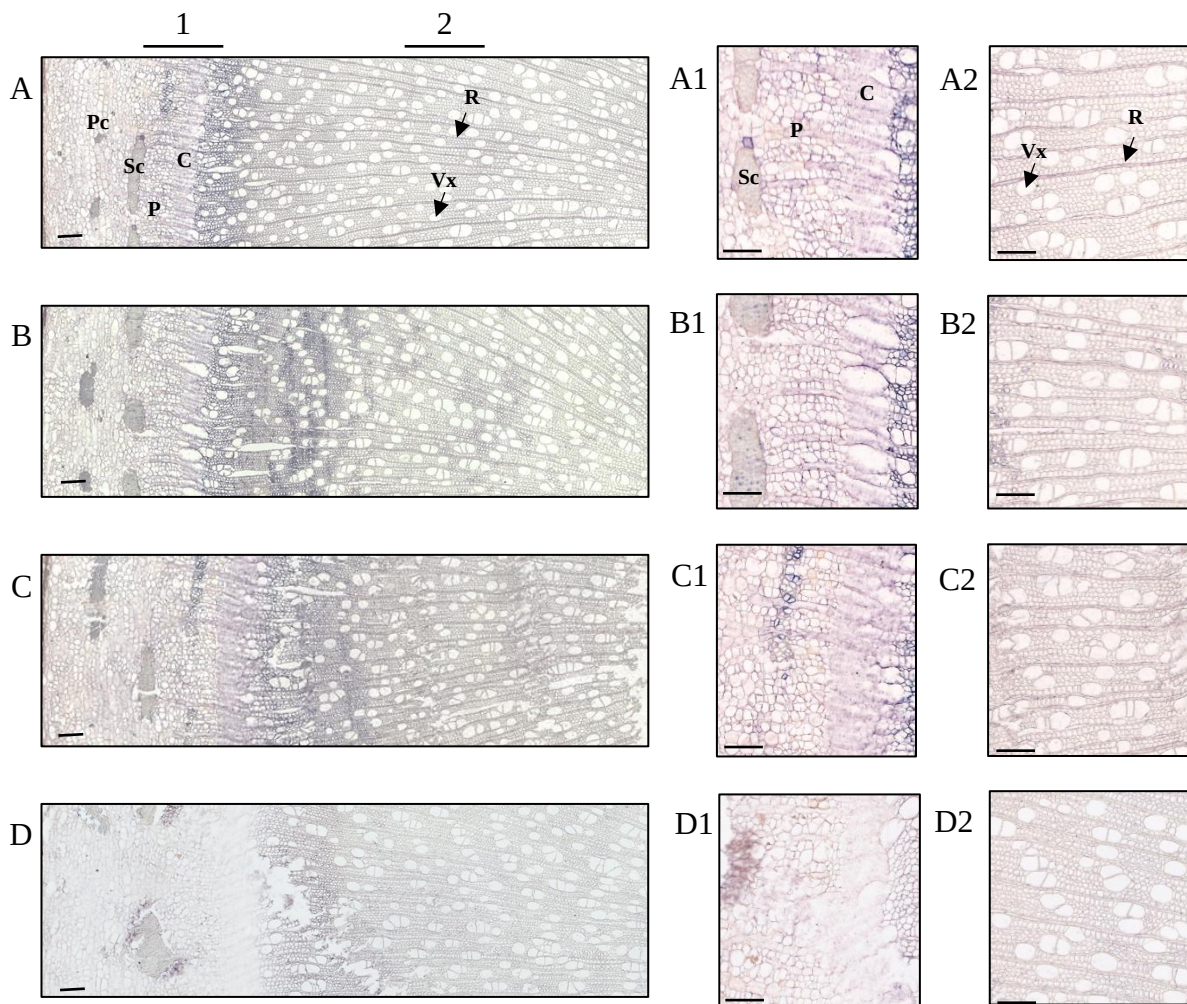


Figure 21 : Immunolocalisation *in situ* des *PtaPIP1* sur un arbre témoin non incliné (A) et sur les faces supérieure (B) et inférieure (C) d'un arbre incliné à 35° pendant 2 h. Les coupes D sont celles du témoin sans anticorps. Les coupes avec numéros (A1 à D2) correspondent au zoom fait sur l'écorce (1) et du xylème (2). Echelle = 100 µm.

Pc : Parenchyme cortical ; P : Phloème ; Sc : Sclérenchyme ; C : Cambium ; R : Rayons ; Vx : Vaisseaux.

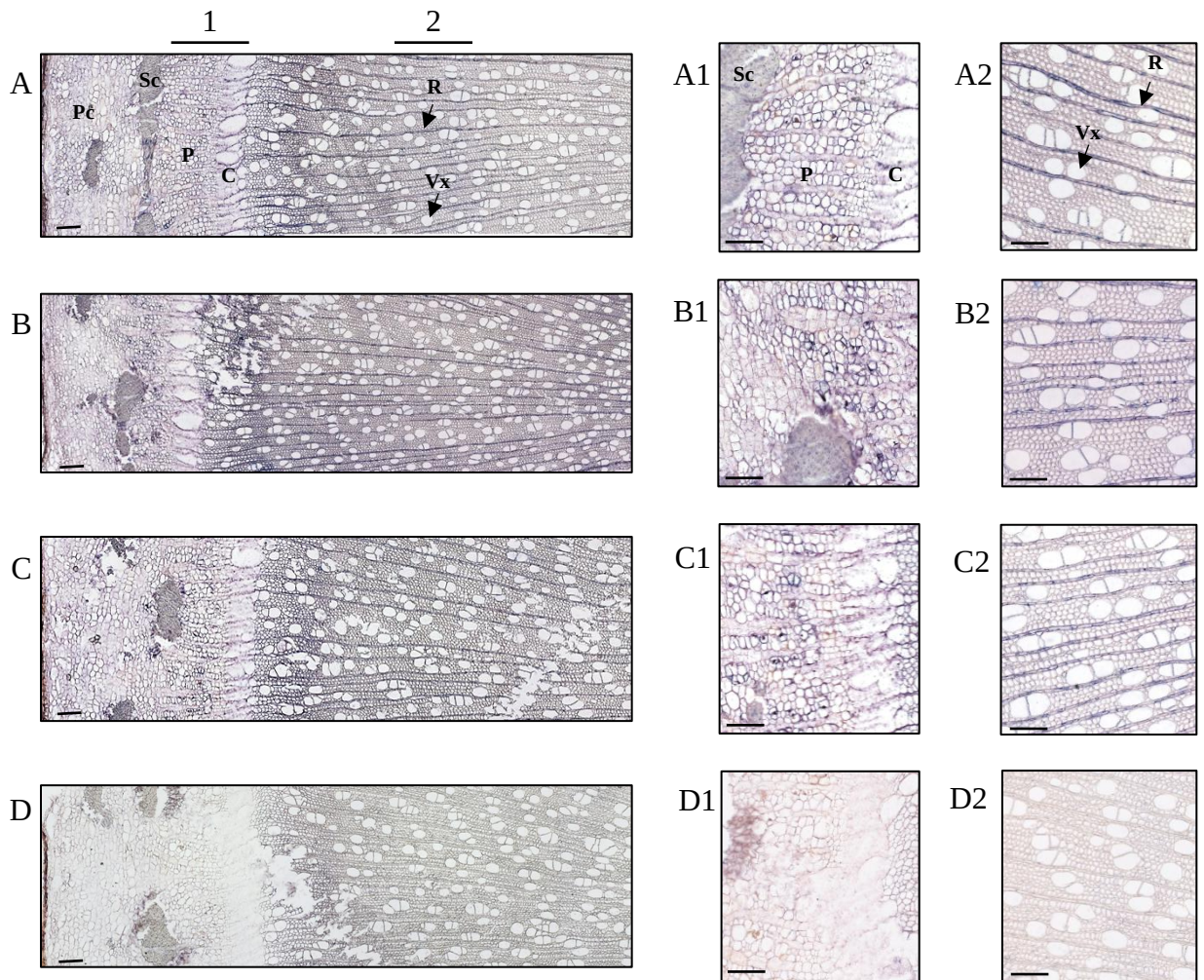


Figure 22 : Immunolocalisation *in situ* des PtaPIP2 sur un arbre témoin non incliné (A) et sur les faces supérieure (B) et inférieure (C) d'un arbre incliné à 35° pendant 2 h. Les coupes D sont celles du témoin sans anticorps. Les coupes avec numéros (A1 à D2) correspondent au zoom fait sur l'écorce (1) et du xylème (2). Echelle = 100 µm.

Pc : Parenchyme cortical ; P : Phloème ; Sc : Sclérenchyme ; C : Cambium ; R : Rayons ; Vx : Vaisseaux.

aussi observable dans le cambium (*cf.* Figure 20 C1 et E1). Les coupes du témoin sans sonde et les coupes hybridées avec la sonde ARN sens ne présentent pas de marquage (*cf.* Figure 20 B, D, F et G). En résumé, les transcrits de *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.4* sont détectés au niveau du phloème, du cambium et des rayons xylémiens proches de vaisseaux sur les tiges inclinées et non inclinées.

4.5. Immunolocalisation *in situ*

Parallèlement aux hybridations *in situ*, les immunolocalisations *in situ* ont été réalisées sur des coupes de tiges non inclinées et sur les faces supérieure et inférieure des tiges des arbres inclinés à 35° pendant 2 h. Les protéines *PtaPIP1* sont localisées au niveau du phloème, du cambium, du jeune xylème et des rayons xylémiens proches des vaisseaux chez l'arbre témoin non incliné (*cf.* Figure 21 A). L'arbre incliné 2 h présente les mêmes zones de marquages que l'arbre droit avec cependant une bande de jeune xylème colorée plus large sur les deux faces de la tige (*cf.* Figure 21 B et C). Le marquage étant plus intense sur la face inférieure de la tige. En ce qui concerne l'immunolocalisation des protéines *PtaPIP2* (*cf.* Figure 22 A), le marquage semble également localisé au niveau du jeune xylème, des rayons xylémiens, du cambium et, contrairement à *PtaPIP1*, de façon abondante dans le phloème en particulier dans le cas des tiges inclinées (*cf.* Figure 22 B et C).

5. Discussion

Une inclinaison de la tige induit la formation de bois de réaction et de bois opposé. Chez le peuplier, le bois opposé est formé sur la face inférieure alors que le bois de réaction est localisé sur la face supérieure de la tige et est appelé bois de tension. Une différence de maturation entre les faces supérieure et inférieure de la tige induit alors le redressement de l'axe. D'après les observations faites chez les plantes herbacées, nous faisons l'hypothèse qu'une élongation différentielle des cellules issues du cambium a lieu entre les faces supérieure et inférieure de la tige de peuplier. Ce mécanisme, s'il existe, au niveau des zones en croissance secondaire pourrait impliquer des aquaporines, protéine-canaux qui facilitent le passage de l'eau à travers la membrane plasmique des cellules.

5.1. Modifications de l'état hydrique

Pour vérifier si les flux d'eau sont modifiés entre les deux côtés de la tige après inclinaison, des capteurs psychrométriques ont été placés de part et d'autre de la tige de manière à obtenir des valeurs de potentiels hydriques. L'utilisation de ces capteurs est très délicate (Dixon et Tyree, 1994). Afin d'obtenir des mesures fiables, l'étanchéité de la chambre doit être parfaite, ce qui est difficile à obtenir avec des dépôts manuels de silicone sur une surface convexe. Les valeurs de potentiel hydrique mesurées sont très variables entre les répétitions biologiques et aussi de part et d'autre de la tige avant l'inclinaison. C'est pourquoi, nous avons été conduits à présenter des valeurs corrigées pour pouvoir réaliser des comparaisons entre nos différentes expériences. La conséquence de ce choix est que nous ne présentons pas des potentiels hydriques mais des différences. Ainsi, des valeurs positives de pression apparaissent sur les courbes. Nous avons observé (*cf.* Figure 13) que les potentiels hydriques de la face inférieure de la tige deviennent moins négatifs après inclinaison alors que ceux de la face supérieure deviennent plus négatifs. Les valeurs de potentiels hydriques de xylème chez le peuplier, en conditions normales résident autour de -5 bars (Laur et Hacke, 2013). Cela explique que dans un arbre non incliné l'eau est normalement sous tension (Dixon et Joly, 1994). Les valeurs moins négatives que nous avons mesurées suggèrent un état de turgescence des cellules de la face inférieure alors que les cellules de la face supérieure tendent à se déshydrater. Deux hypothèses peuvent être alors proposées. Premièrement, les différences entre faces supérieure et inférieure résulteraient d'un transport radial de l'eau, par les rayons ligneux, de la face supérieure vers la face inférieure de la tige en réponse à l'inclinaison. Deuxièmement, le transport longitudinal est affecté par l'inclinaison, avec une tension du xylème plus forte du côté supérieur de la tige. Une augmentation de la tension peut

être corrélée à une augmentation de la conductance stomatique, car les mouvements de l'eau au sein de la feuille sont engendrés par la transpiration, moteur de la montée de la sève brute le long de la plante (Dixon et Joly, 1894).

Afin de vérifier l'hypothèse d'un différentiel de transport longitudinal de l'eau lors de l'inclinaison de la tige, la conductance stomatique d'une feuille de chaque côté de la tige a donc été suivie.

Les valeurs de conductance stomatique classiquement observées chez le peuplier sont de l'ordre de $200 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Laur et Hacke, 2013). Ces valeurs correspondent assez bien à celles mesurées sur les arbres droits. Par contre pour les arbres inclinés, les valeurs de conductance stomatique sont très faibles, et correspondent à des valeurs observées chez des arbres ayant subis un stress hydrique (Spark et Black, 1999). Il est possible que l'inclinaison ait provoqué des vibrations qui ont conduit à une fermeture des stomates. En effet, Scarth (1932) a montré que les stress abiotiques tels qu'une coupure, la lumière ou encore la température provoquent la fermeture des stomates chez *Zebrina pendula* (communément appelé Misère).

Aussi bien chez les arbres droits que chez les arbres inclinés, il n'y a pas de différence significative entre les deux côtés de la tige pour les valeurs de conductance stomatique. L'inclinaison aurait pu entraîner une baisse de la conductance stomatique pour les feuilles du côté inférieur de la tige si l'ombre portée par l'arbre avait été notable. En effet, les mouvements des stomates sont influencés par de nombreux facteurs et notamment par la lumière (Laur et Hacke, 2013). Dans nos conditions expérimentales, nous pouvons supposer que l'éclairement était équivalent sur les faces supérieure et inférieure des plantes. L'intensité et la qualité de la lumière reçue par les feuilles des faces supérieure et inférieure doivent être mesurées pour discuter plus avant de ce point.

Les conductances stomatiques après inclinaison ne semblent donc pas corrélées aux résultats de potentiel hydrique mesurés au niveau de la tige. Aussi, une différence de potentiel hydrique entre les deux côtés de la tige inclinée ne semble pas entraîner de modifications significatives des valeurs de conductance stomatique des feuilles, ce qu'on aurait pu supposer d'après la théorie de la tension-cohésion (Dixon et Joly, 1894). Ceci suggère que la modification des flux d'eau observée au bas de la tige, future zone de redressement de l'axe vertical, est locale et pourrait mettre en jeu une modulation du transport radial de l'eau.

5.2. Modulation de l'expression des aquaporines PIP

Dans le cas où un transfert radial de l'eau ait lieu entre les côtés supérieur et inférieur de la tige lors de l'inclinaison, des canaux à eau de type aquaporines, pourraient être impliquées. En effet, d'après Siefritz *et al.* (2002) le transfert radial est important par les voies transcellulaire et symplasmique, ce qui impliquent la traversée de la membrane plasmique. Cette structure étant quasi-imperméable vis-à-vis de l'élément eau (20%) , le passage de l'eau à travers elle est alors facilité par ces aquaporines (Maurel, 1997). Parmi ces 5 sous-familles d'aquaporines présentes dans l'ensemble du système membranaire d'une cellule, les PIP sont majoritaires au niveau du plasmalemme, et seront les seules étudiées lors de cette étude.

Tout d'abord, nous avons étudié les variations de l'expression des gènes *PtaPIP*, afin de vérifier si les aquaporines sont impliquées dans la réponse au stimulus gravitropique. Ce type d'analyse, suite à une stimulation gravitropique chez les arbres, n'a jamais été décrit dans la littérature. Chez le peuplier, 15 PIPs ont été identifiées (Cohen *et al.*, 2013). Globalement, la majorité des isoformes *PtaPIP1* et *PtaPIP2* analysées montre une expression plus faible lors de l'inclinaison. Seules quelques *PtaPIP* présentent une sur-expression dans le xylème (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP2.4* et *PtaPIP2.7*) et dans l'écorce (*PtaPIP1.4*, *PtaPIP2.1*, *PtaPIP2.4* et *PtaPIP2.10*). D'après Suga *et al.*, (2001) et Maurel *et al.*, (2008), la transcription des gènes d'aquaporines est régulée indépendamment dans les organes. Tyermann *et al.* (2002) rapportent que l'augmentation d'expression des PIPs est associée à la différenciation cellulaire et l'importance du flux d'eau à travers les cellules. La majorité des gènes *PtaPIP* sur-exprimés est observée pour la face inférieure du tissu (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP2.1*, *PtaPIP2.4*, *PtaPIP2.7* et *PtaPIP2.10*), ce qui correspond au côté de la tige présentant un potentiel hydrique moins négatif donc une teneur en eau plus importante. Cette augmentation asymétrique de l'expression peut conduire à une augmentation de la présence de *PtaPIP* dans la membrane plasmique des cellules, et ainsi contribuer à l'élargissement de la paroi cellulaire du côté inférieur de la tige comme cela a été observé chez les plantes herbacées (Hu *et al.*, 2007). Un lien entre l'expansion cellulaire et l'expression des gènes *PtaPIP* et *PtaTIP* a par ailleurs été démontré (Maurel *et al.*, 2008).

Ensuite, la localisation des transcrits de certains gènes *PtaPIP* a été réalisée. La technique d'hybridation *in situ* est basée sur une révélation enzymatique ce qui rend cette méthode moins sensible qu'une PCR quantitative. Les résultats obtenus sont donc de nature qualitative, ils permettent de localiser l'expression d'un gène dans des tissus spécifiques. Les informations recueillies sont complémentaires à celles obtenues par la technique de PCR

quantitative. Nous avons cherché à localiser les transcrits *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.4* dans les tiges droites et inclinées 2 h. Les transcrits de *PtaPIP1.3* et de *PtaPIP2.4* sont localisés au niveau des cellules vivantes (phloème, parenchyme cortical, rayons xylémiens proches des vaisseaux) et en différenciation (cambium). Le phloème et le parenchyme cortical servent de réserve hydrique pour les cellules en croissance secondaire (cambium) tandis que les rayons xylémiens jouent un rôle dans la communication entre le bois et l'écorce (Sevanto *et al.*, 2011). Cette distribution stratégique des transcrits au sein de la tige suggère l'implication des aquaporines dans le transport radial de l'eau au sein de la tige.

Enfin, pour compléter notre approche, une étude de la distribution des protéines PIP1 et PIP2 au sein de la tige entre les arbres droits et des arbres inclinées à 35° pendant 2 h a été réalisée grâce à la technique d'immunolocalisation *in situ*. La méthode de révélation est similaire à celle de l'hybridation *in situ*. Les résultats obtenus sont donc de nature qualitative. Les protéines PIP1 et PIP2 sont présentes au niveau de l'écorce, du cambium, du jeune xylème et des rayons xylémiens proches des vaisseaux. La distribution des protéines PIP2 n'est pas modifiée par l'inclinaison. L'inclinaison semble provoquer une plus large distribution des protéines PIP1 dans le xylème jeune. Néanmoins, aucune différence n'est observée entre les faces supérieure et inférieure de la tige des arbres inclinés. Cette distribution spatiale des protéines PIP1 ne correspond pas à celle observée pour les transcrits *PtaPIP1.3*. Ceci peut être expliqué par les cibles des anticorps Anti-PIP1 utilisés. En effet, ceux-ci ne sont pas spécifiques de l'isoforme *PtaPIP1.3* et révèlent de toutes les protéines PIP1. De plus, Otto et Kaldenhoff (2000) ont démontré, chez le tabac, que la cellule où a lieu la transcription des gènes peut être différente de la cellule où les protéines intégreront la membrane biologique.

6. Conclusions – Perspectives

La formation du bois de tension suite à une gravistimulation implique des processus moléculaires spécifiques qui, bien qu'ils soient beaucoup étudiés depuis plusieurs années, restent très peu compris. Paradoxalement, l'implication des flux d'eau dans sa maturation n'a jamais été explorée. Tout d'abord, nous avons obtenu des résultats suggérant l'existence de flux d'eau allant de la face supérieure vers la face inférieure de la tige inclinée à 35°. Les données de conductance stomatique foliaire suggèrent que ces flux hydriques sont localisés à la base de la tige, future zone de redressement. Une approche moléculaire a ensuite permis de caractériser les modulations d'expressions relatives des gènes *PtaPIPs* induites par l'inclinaison, montrant que des aquaporines PIP, insérées dans la membrane plasmique sont impliquées dans les réponses au stimulus gravitropique. Des gènes candidats ont pu être sélectionnés (*PtaPIP1.1*, *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.4*) pour la localisation de leurs transcrits. Certes, aucune modification de la distribution des transcrits n'a été mise en évidence entre les arbres « témoin non inclinés » et les arbres « inclinés 2h à 35° », néanmoins, cette distribution laisse supposer que les aquaporines *PtaPIP1.3* et *PtaPIP2.4* sont impliquées dans un transport radial de l'eau après inclinaison. Enfin, la distribution des protéines PIP1 a été modifiée par l'inclinaison. En effet, une inclinaison de 2h a provoqué l'augmentation des PIP1 dans le jeune xylème.

L'ensemble de ces observations suggère qu'une stimulation gravitropique induit des modifications des flux d'eau de la face supérieure à la face inférieure de la tige. Le transport radial de l'eau modifié par l'inclinaison pourrait s'effectuer en partie *via* les aquaporines.

Les mesures psychrométriques et de conductance stomatique ne semblent pas être corrélées. Ces techniques ne permettent d'étudier que localement le statut hydrique d'une plante (ici la partie basale de la tige et les feuilles). Pour se situer à l'échelle de la plante entière, réaliser un bilan hydrique de la plante par des mesures de potentiel hydrique foliaire ainsi que de transpiration et de PAR (Rayonnement Photosynthétique Actif) est à planifier. Ces mesures devront être complétées par des relevés de conductance stomatique sur plusieurs feuilles par côté de la tige ainsi qu'à différentes hauteurs.

Les hybridations *in situ* et les immunolocalisations *in situ* ont été réalisées sur des tiges inclinées 2h. Il serait aussi informatif de réaliser les expériences de localisation des transcrits et des protéines PIP dès 30 min pour mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la gestion des flux hydriques pendant l'inclinaison. Dans ce présent mémoire, la localisation des transcrits ne concerne que deux isoformes. D'après Kirch *et al.* (2000), une

isoforme peut être spécifique d'un type cellulaire ou d'un stade de développement. La détermination de la localisation d'autres transcrits dont l'expression est modifiée suite à l'inclinaison de la tige, tels *PtaPIP1.1*, *PtaPIP2.1* ou *PtaPIP2.7*, paraît alors nécessaire. Lors des expériences d'immunolocalisation, nous avons eu à notre disposition des anticorps qui n'étaient pas spécifiques d'une isoforme donnée. L'utilisation d'anticorps spécifiques des isoformes différenciellement exprimées en PCR quantitative permettrait de vérifier si ces protéines sont aussi différenciellement distribuées entre les faces supérieure et inférieure de la tige inclinée. De même, l'approche quantitative par Western blot sur les aquaporines PIP de la membrane plasmique nous informerait sur une possible régulation de la quantité des protéines lors d'une inclinaison.

Les aquaporines TIP sont présentes sur la membrane de la vacuole (Maurel *et al.*, 2008). Ce compartiment intracellulaire a le pouvoir de se remplir d'eau pour permettre à la cellule de s'accroître. Des études moléculaires de suivi d'expression transcriptionnelle des gènes *PtaTIP* ainsi que la localisation sub-tissulaire de ces transcrits lors d'une stimulation gravitropique seraient pertinentes car elles fourniraient d'importantes informations très complémentaires à cette première étude.

Enfin, pour se redresser les arbres respectent plusieurs étapes dont une phase de latence, de courbure et de décourbure autotropique (Coutand *et al.*, 2007). Les expériences réalisées ici se placent dans la phase de latence. Il serait très intéressant d'étendre ce suivi des flux hydriques et l'expression des aquaporines pendant ces phases de courbure et de décourbure.

Bibliographie

- Alexandersson E, Frayse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant molecular biology* **59**: 469–84
- Azri W** (2009) Mécanisme moléculaire de la graviperception chez le peuplier.
- Besnard G, Carlier G** Potentiel hydrique et conductance stomatique des feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) dans une forêt alluviale du Haut-Rhône français. *Annales des sciences forestières* **47**: 353–365
- Blancaflor EB, Masson PH, Division PB, Samuel T, Noble R, Parkway SN** (2003) Update on Tropisms Plant Gravitropism. Unraveling the Ups and Downs of a Complex Process 1. *Plant physiology* **133**: 1677–1690
- Brunel N** (2002) Knap2, a class I KN1-like gene is a negative marker of bud growth potential in apple trees (*Malus domestica* [L.] Borkh.). *Journal of Experimental Botany* **53**: 2143–2149
- Catalá C, Rose JK, Bennett AB** (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant physiology* **122**: 527–34
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113–116
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ** (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**: 749–64
- Chen D-H, Wang M, Wang H-G, Zhang W** (2012) A type of voltage-dependent Ca^{2+} channel on *Vicia faba* guard cell plasma membrane outwardly permeates K^{+} . *Protoplasma* **249**: 699–708
- Chrispeels MJ, Maurel C** (1994) Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant physiology* **105**: 9–13
- Cochard H, Venisse J-S, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree MT, Sakr S** (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant physiology* **143**: 122–33
- 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**: 1229–37
- Coutand C, Fournier M, Moulia B** (2007) The gravitropic response of poplar trunks: key roles of prestressed wood regulation and the relative kinetics of cambial growth versus wood maturation. *Plant physiology* **144**: 1166–80

- Déjardin A, Laurans F, Arnaud D, Breton C, Pilate G, Leplé J-C** (2010) Wood formation in Angiosperms. *Comptes rendus biologies* **333**: 325–34
- Dixon H** (1894) Théorie de la tension-cohésion. *Physiological transaction of the royal society of London* **186**: 563–576
- Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Lacointe A, Julien J-L, Chrestin H, Sakr S** (2009) Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Annals of botany* **104**: 635–47
- Dusotoit-Coucaud A, Kongsawadworakul P, Maurousset L, Viboonjun U, Brunel N, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Sakr S** (2010) Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (HbSUT1B) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Tree physiology* **30**: 1586–98
- Hachez C, Besserer A, Chevalier AS, Chaumont F** (2013) Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends in plant science* 1–9
- Hacke UG, Plavcová L, Almeida-Rodriguez A, King-Jones S, Zhou W, Cooke JEK** (2010) Influence of nitrogen fertilization on xylem traits and aquaporin expression in stems of hybrid poplar. *Tree physiology* **30**: 1016–25
- Hedfalk K, Törnroth-Horsefield S, Nyblom M, Johanson U, Kjellbom P, Neutze R** (2006) Aquaporin gating. *Current opinion in structural biology* **16**: 447–56
- Hu L, Cui D, Neill S, Cai W** (2007) OsEXPA4 and OsRWC3 are involved in asymmetric growth during gravitropic bending of rice leaf sheath bases. *Physiologia Plantarum* **130**: 560–571
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W** (2005) Nitric Oxide Mediates Gravitropic Bending in Soybean Roots 1 [w]. *Plant physiology* **137**: 663–670
- Hukin D, Doering-Saad C, Thomas CR, Pritchard J** (2002) Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta* **215**: 1047–56
- Ishikawa H, Evans ML** (1997) Novel software for analysis of root gravitropism: comparative response patterns of *Arabidopsis* wild-type and *axr1* seedlings. *Plant, cell & environment* **20**: 919–28
- Javot H** (2002) The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany* **90**: 301–313
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Frayse L, Weig a R, Kjellbom P** (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant physiology* **126**: 1358–69

- Joseleau J-P, Imai T, Kuroda K, Ruel K** (2004) Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* **219**: 338–45
- Jourez B** (1997a) Le Bois de tension 1. Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnol Agron Soc Environ* **1**: 100–112
- Jourez B** (1997b) Le Bois de tension 2. Evaluation quantitative, formation et rôle dans l'arbre. *Biotechnol Agron Soc Environ* **1**: 167–177
- Jourez B, Riboux A, Leclercq A** (2001) ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF TENSION WOOD AND. *IAWA Journal* **22**: 133–157
- Kaldenhoff R, Ribas-Carbo M, Sans JF, Lovisolo C, Heckwolf M, Uehlein N** (2008) Aquaporins and plant water balance. *Plant, cell & environment* **31**: 658–66
- Kirch H, Vera-estrella R, Gollack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ** (2000) *Mesembryanthemum crystallinum* 1. *Plant physiology* **123**: 111–124
- Laur J, Hacke U, Jacobsen A, Plavcova L, Arshad M** (2012) Meetings New research on plant – water relations examines the molecular, structural, and physiological mechanisms of plant responses to their environment. *New Phytologist* **196**: 345–348
- Laur J, Hacke UG** (2013) Transpirational demand affects aquaporin expression in poplar roots. *Journal of experimental botany* **64**: 2283–93
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* **25**: 402–8
- Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, Carpin S, Tournaire-Roux C, Maurel C, Fumanal B, et al** (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of experimental botany* **63**: 2217–30
- Maurel C** (1997) Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **48**: 399–429
- Maurel C** (2007) Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS letters* **581**: 2227–36
- Maurel C, Chrispeels MJ** (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant physiology* **125**: 135–8
- Maurel C, Santoni V, Luu D-T, Wudick MM, Verdoucq L** (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current opinion in plant biology* **12**: 690–8
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual review of plant biology* **59**: 595–624

- Meyer RF, Boyer JS** (1972) Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* **108**: 77–87
- Miyamoto N, Ookawa T, Takahashi H, Hirasawa T** (2002) Water uptake and hydraulic properties of elongating cells in hydrotropically bending roots of *Pisum sativum* L. *Plant & cell physiology* **43**: 393–401
- Miyashima S, Sebastian J, Lee J-Y, Helariutta Y** (2013) Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO journal* **32**: 178–93
- Moullia B, Fournier M** (2009) The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. *Journal of experimental botany* **60**: 461–86
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**: 473–492
- Muto Y, Segami S, Hayashi H, Sakurai J, Murai-Hatano M, Hattori Y, Ashikari M, Maeshima M** (2011) Vacuolar Proton Pumps and Aquaporins Involved in Rapid Internode Elongation of Deepwater Rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**: 114–122
- Nizinski JJ, Montoroi J-P, Silvera N, Lointier M** (2013) Use of the Dixon-Tyree stem hygrometer in a rubber tree plantation. *Agricultural and Forest Meteorology* **173**: 100–106
- Paux E, Tamasloukht M, Ladouce N, Sivadon P, Grima-Pettenati J** (2004) Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. *Plant molecular biology* **55**: 263–80
- Péret B, Li G, Zhao J, Band LR, Voß U, Postaire O, Luu D-T, Da Ines O, Casimiro I, Lucas M, et al** (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature cell biology* **14**: 991–8
- Pilate G** (2003) Peupliers à lignines modifiées : du génie génétique à l'industrie papetière. *Medecine Science* **19**:18–20.
- 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. *Biotechnology letters* **26**: 509–15
- Poupard P, Brunel N, Leduc N, Viémont J-D, Strullu D-G and Simoneau P** (2001) Expression of a *Bet v 1* homologue gene encoding a PR 10 protein in birch roots: induction by auxin and localization of the transcripts by *in situ* hybridization. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 57 - 63
- Prytz G, Futsaether CM, Johnsson A** (2003) Thermography studies of the spatial and temporal variability in stomatal conductance of *Avena* leaves during stable and oscillatory transpiration. *New Phytologist* **158**: 249–258

- Sakr S, Alves G, Maurel K, Fleurat-lessard P, Julien J, Chrispeels MJ** (2003) Plasma Membrane Aquaporins Are Involved in Winter Embolism Recovery in Walnut Tree 1. *Plant physiology* **133**: 630–641
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M** (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant & cell physiology* **46**: 1568–77
- Samuels AL, Kaneda M, Rensing KH** (2006) The cell biology of wood formation: from cambial divisions to mature secondary xylem 1. *Can J Bot* **84**: 631–639
- Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C** (2006) Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *The Biochemical journal* **400**: 189–97
- Scarth G** (1932) Mechanism of the action of light and other factors on stomatal movement. *Plant physiology* **7**:481–504
- Schnabl H, Kriegs B, Thiesen R** (2002) Signal transduction and gene expression during graviresponse in sunflower hypocotyls. “In: Proceedings of ”Life in space for life on Earth” 299–300
- Secchi F, Zwieniecki M a** (2010) Patterns of PIP gene expression in *Populus trichocarpa* during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP1 aquaporin subfamily as moderators of refilling process. *Plant, cell & environment* **33**: 1285–97
- Sevanto S, Hölttä T, Holbrook NM** (2011) Effects of the hydraulic coupling between xylem and phloem on diurnal phloem diameter variation. *Plant, cell & environment* **34**: 690–703
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R** (2002) PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in Tobacco : From Cellular Effects to Function in Plants. *The Plant cell* **14**: 869–876
- Soto G, Alleva K, Amodeo G, Muschietti J, Ayub ND** (2012) New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible. *Gene* **503**: 165–76
- Sparks JP, Black RA** (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree physiology* **19**: 453–459
- Suga S, Komatsu S, Maeshima M** (2002) Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant & cell physiology* **43**: 1229–37
- Telewski FW** (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American journal of botany* **93**: 1466–76
- Thimann K V., Bonner J** (1932) Studies on the growth hormone of plants. II. The entry of growth substance into the plant. *Physiology* 692–701

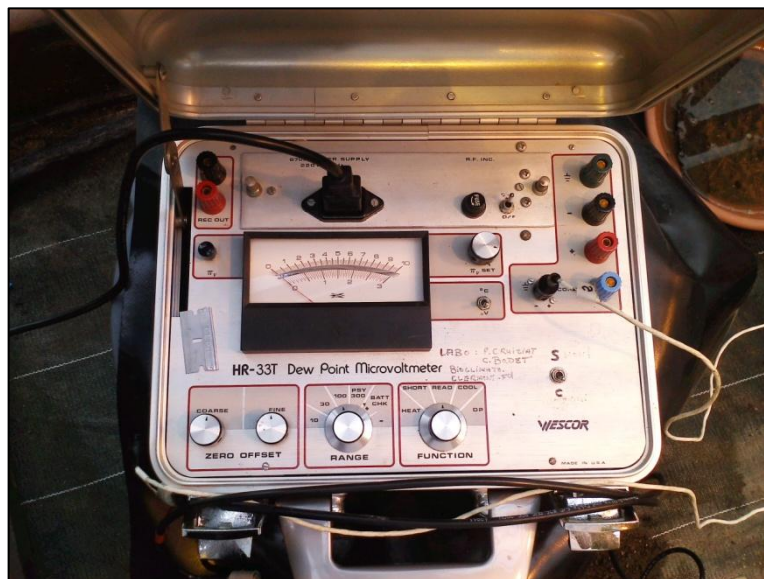
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D-T, Bligny R, Maurel C** (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393–7
- Tungngoen K, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Katsuhara M, Brunel N, Sakr S, Narangajavana J, Chrestin H** (2009) Involvement of HbPIP2;1 and HbTIP1;1 aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner liber and latex cells in *Hevea brasiliensis*. *Plant physiology* **151**: 843–56
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H** (2002a) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels. *Plant, Cell and Environment* **25**: 173–194
- 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 & environment* **34**: 655–68
- Wortemann R** (2011) Etude de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez *Fagus sylvatica* L.
- Yang J, Park S, Kamdem DP, Keathley DE, Retzel E, Paule C, Kapur V, Han K-H** (2003) Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant molecular biology* **52**: 935–56
- Zhao C-X, Shao H-B, Chu L-Y** (2008) Aquaporin structure-function relationships: water flow through plant living cells. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* **62**: 163–72

Annexes

Annexe 1 : Dispositif d'inclinaison sur un peuplier. Le support à la base du pot permet une inclinaison de 35° de l'arbre (Source INRA UMR PIAF, Clermont Ferrand)



Annexe 2 : Psychromètre HR-33 T (Wescor, Guelph, Ontario, Canada)



Résumé

Le bois de tension résulte d'une maturation différentielle de cellules issues du cambium entre les côtés opposés du tronc de l'arbre pour permettre son redressement lorsque celui-ci a été incliné. Les aquaporines PIP, protéine-canaux qui facilitent le passage de l'eau à travers la membrane plasmique, semblent impliquées dans la formation du bois normal. Cette étude est basée sur l'hypothèse que les aquaporines PIP seraient impliquées dans la formation du bois de tension en régulant différentiellement les flux d'eau entre les deux côtés de la tige après gravistimulation.

Une approche écophysiological a permis de mettre en évidence des modifications des flux d'eau locaux de la face supérieure à la face inférieure de la tige inclinée à 35°. Par qRT-PCR, des modulations d'expression des PIP ont été montrées. Des techniques cytologiques ont permis de détecter la modification de la distribution des PIP dans la tige suite à une stimulation gravitropique. Ces résultats suggèrent que les mouvements d'eau engendrés par l'inclinaison seraient dus à des modifications du transport radial d'eau dans la tige et ce, *via* la régulation cellulaire des aquaporines PIP.

Mots-clés : gravitropisme, eau, aquaporine, PIP, peuplier, psychromètre, PCR quantitative, hybridation- immunolocalisation *in situ*

Abstract

Tension wood results from the differential maturation of wood cells derived from the cambium between opposite sides of the trunk of the tree to achieve its adaptive reorientation after tilting. Aquaporins PIP, channel proteins which facilitate the passage of water across the plasma membrane seem to be involved in the formation of normal wood. This study is based on the hypothesis that PIP aquaporins are involved in the formation of tension wood by differentially regulating the water flow between the two sides of the stem after gravistimulation.

Using an ecophysiological approach, changes in local water flow from the upper to the lower side of the 35° inclined stem were highlighted. Using qRT-PCR, modulations of expression of PIP were observed. Cytological techniques allowed to detect the change of PIP distribution in the stem after gravistimulation. These results suggest that the water movements caused by the inclination may be due to changes in radial transport of water in the stem and this, *via* the cellular regulation of PIP aquaporins.

Keywords: gravitropism, water, aquaporin, PIP, poplar, psychrometer, quantitative PCR, *in situ* hybridization- immunolocalization