

MASTER II Biologie et Environnement SPECIALITÉ : GEPV

Rapport de stage présenté par: Jérôme Peyrot

*SUJET: Différenciation cellulaire et
acteurs moléculaires de l'acclimatation
de la formation du bois aux stress
mécaniques*

Responsables du Stage: Eric Badel (INRA) et Mélanie Decourteix (UBP)

Unité Mixte de Recherche PIAF
INRA-Université Blaise Pascal.
Site des Cézéaux:
24 avenue des Landais
BP 80026
63171 Aubière



UMR PIAF
INRA Site de Crouël
234, av du Brézet
63100 Clermont-Fd

Résumé

Comprendre comment les arbres acclimatent leurs structures externe et interne aux sollicitations quotidiennes du vent pourrait permettre de sélectionner des plantes plus résistantes aux perturbations prévues plus fortes et plus intenses dans les années à venir. Nous avons étudié l'impact de deux régimes de flexions répétées sur la croissance et les caractéristiques du bois de flexion de *Populus tremula x alba*. Les croissances primaire et secondaire sont respectivement diminuées et augmentée en réponse aux flexions. A l'échelle tissulaire, nous avons observé une diminution du nombre et du diamètre des vaisseaux du bois. De plus, l'épaisseur des parois des fibres présentes dans la zone sollicitée en tension est fortement augmentée, contrairement à la zone sollicitée en compression. La zone tendue du bois de flexion montre donc de nombreuses similitudes avec le bois de tension habituellement formé dans le cadre des tropismes. A l'échelle moléculaire, l'expression du gène *PtaXLIM1a* semble sur-exprimée dans la zone de bois tendu en réponse à des flexions modérées mais réprimé pour le régime de flexions le plus fréquentes. Ceci montre l'intérêt d'étendre notre étude à d'autres paramètres pour une meilleure compréhension des effets du vent sur la différenciation et la qualité du bois.

Mots clefs : Vent ; Acclimatation ; Bois ; Flexion ; Croissance primaire ; Croissance secondaire ; Bois de flexion ; Anatomie, Q-PCR.

Abstract

A better understanding of acclimation of external and internal structures of trees to daily wind loads is needed to select plants presenting a better resistance to stronger and more intense perturbations that are predicted over the next years. We studied the impact of two different repeated flexure treatments on the growth of young poplars (*Populus tremula x alba*) and on the anatomical characteristics of their flexure wood. Primary and secondary growths were respectively reduced and increased in response to stem bending. At the tissue level, we observed a decrease of the number and diameter of vessels. Moreover, unlike what was observed for the compressed tissues, the wall thickness of fibers in the stretched zone was greatly increased. The stretched zone of flexure wood shows many similarities with the tension wood that is usually formed in the context of the tropisms. At the molecular level, *PtaXLIM1a* appeared to be overexpressed in the stretched zone of the xylem in response to moderate bending; but repressed for the more frequent bending treatments. This result highlights the existing interest to extend our work to other settings in order to gain a better understanding of the effects of wind on wood differentiation and quality..

Keywords: Wind; Acclimatization; Wood; Bending; Primary growth; Secondary growth; Flexure Wood; Anatomy; Q-PCR.

Liste des abréviations

13F : traitement de 13 flexions unidirectionnelles par jour tous les jours

1F : traitement de 1 flexion unidirectionnelle par jour durant 3 jours consécutifs par semaine

1F72h : traitement de 1 unique flexion unidirectionnelle 72h avant le prélèvement de l'arbre

(C) : zone de tige en compression

(N) : ligne neutre

(T) : zone de tige en tension

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

cm : centimètre

Cp : croissance primaire de tige

CPMCW : cytosquelette-membrane plasmique-paroi

°C : degrés Celsius

Cl : clore

Cs : croissance secondaire de tige

Cv : couverture vasculaire

dNTP : déoxy Nucléoside triphosphate

Dt : diamètre de tige

Dv : diamètre de vaisseau

dv : densité de vaisseaux

ΔD : accroissement moyen en diamètre

ΔH : accroissement moyen en hauteur

ΔL : différence de longueur

EF1 α : Facteur d'élongation 1 α

Liste des abréviations

h : heure

Li : lithium

MS : mécanosensible

mm : millimètre

µm : micromètre

Oligo(dT) : oligodéoxythymine

PCR : polymerase chain reaction

PEG : polyéthylène glycol

Qr : quantité relative de transcripts d'un gène cible par rapport à un gène de ménage

RNase : ribonucléase

RNase Out : inhibiteur de RNase

ROS : espèce réactive de l'oxygène

RT : transcription reverse

Tm : température d'hybridation

WAK : wall associated kinase

ZFP2 : zinc finger protein 2

Remerciements

Je tiens à remercier Jean-Louis Julien (Directeur de l'Unité Mixte de recherche Physique et Physiologie Intégrative de l'Arbre Fruitier et Forestier) de m'avoir accueilli dans son unité.

Je remercie également mes maîtres de stages, Eric Badel et Mélanie Decourteix, d'avoir dirigé ce travail. Leurs conseils, leur professionnalisme et leur motivation ont été très importants pour moi.

Merci à Pierre et Brigitte pour leur convivialité et l'aide importante qu'ils m'ont apportée lors de mon passage à Crouël.

Merci à Nicole et Jérôme pour leur aide précieuse qu'ils m'ont apportés lors de mon passage aux Cézeaux.

Je tiens aussi à dire un grand merci aux membres de l'unité du PIAF chercheurs, techniciens et stagiaires du site des Cézeaux et de Crouël pour leur accueil chaleureux.

Sommaire

Introduction.....	1
I. Bibliographie.....	2
I.1. Réponses de croissances aux stimuli mécaniques.....	2
I.1.a. Réponse en croissance primaire.....	2
I.1.b. Réponse en croissance secondaire.....	3
I.1.c. Variables physiques perçues par la plante lors d'une flexion.....	3
I.1.d. Réseau de perception des stimuli mécanique, et de transduction du signal.....	4
I.2. Effet des stimuli mécaniques sur la différenciation du bois.....	5
I.2.a. Formation et structure du bois.....	5
I.2.b. Caractéristiques du bois de réaction.....	6
I.2.c. Rôle des phytohormones dans la formation du bois de réaction.....	7
I.2.e. Acteurs moléculaires de la mise en place du bois de tension.....	8
I.3. Objectifs et approche adoptée.....	10
II. Matériels et Méthodes.....	11
II.1. Matériel végétal.....	11
II.2. Application de flexions contrôlées sur les tiges.....	12
II.2.a. Principe de flexion de tige par robots automatisés.....	12
II.2.b. Expérimentation n°1.....	12
II.2.c. Expérimentation n°2.....	12
II.3. Mesures de croissances primaires et secondaires.....	13
II.4. Prélèvement.....	13
II.4.a. Expérimentation n°1.....	13
II.4.b. Expérimentation n°2.....	13
II.5. Analyses cytologiques.....	13
II.5.a. Observations anatomiques à l'échelle tissulaire.....	13
II.5.b. Caractérisation cytologique à l'échelle pariétale.....	14
II.6. Réponses moléculaires.....	14
II.6.a. Extraction d'ARNs.....	15
II.6.b. Synthèse d'ADNc.....	15
II.6.c. PCR Quantitative relative.....	15
II.7. Analyses statistique.....	16

III. Résultats.....	16
III.1. Effet de flexions répétées sur la croissance de tiges de peuplier.....	16
III.1.a. Impact des flexions de tiges sur la croissance primaire.....	17
III.1.b. Impact des flexions de tiges sur la croissance secondaire.....	17
III.2. Effets de flexions répétées de la tige sur les caractéristiques anatomiques des vaisseaux du bois	18
III.3. Effet de flexions répétées sur les caractéristiques pariétales des fibres de bois de peuplier	19
III.3.a. Impact des flexions répétées sur l'épaisseur de paroi des fibres.....	19
III.3.b. Effet de flexions répétées sur la formation de couche G dans le bois de flexion	19
III.4. Réponses moléculaires dans la zone en croissance secondaire de tige de peuplier après différents régimes de flexions.....	20
IV. Discussion, conclusion générale et perspectives.....	20

Introduction

Contrairement aux animaux, les plantes n'ont pas la possibilité de changer d'environnement en se déplaçant. Leur seule stratégie est de s'acclimater rapidement aux stress environnementaux qu'elles subissent sous peine de disparaître. Ces stress peuvent être d'origines multiples : hydrique, thermique, nutritionnel, physique... Les stress qui nous intéressent dans ce travail sont les stress d'origine mécanique. Parmi ces stimuli, on peut distinguer des stress permanents, ou quasi permanents, tels que la gravité ainsi que les variations de charges induites par la présence de neige ou de fruits (Alméras *et al.*, 2004, Telewski, 2006). S'ajoutent ensuite des stress mécaniques temporaires d'un environnement fluctuant tel que le vent ; facteur de contrainte multicomposantes (fréquence, force vitesse, durée) et très variable, qui impacte le développement des plantes.

Le rapport du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) de 2009 prévoit un climat de plus en plus fluctuant avec une augmentation de la fréquence des vents violents sous lesquels les arbres non-acclimatés peuvent subir des dégâts aux conséquences économiques importantes. C'est pourquoi il est important de comprendre les mécanismes d'acclimation des arbres aux sollicitations mécaniques engendrées par le vent. Le laboratoire UMR-547-PIAF étudie l'effet des stress abiotiques chez les arbres ; en particulier sur le peuplier, plante modèle dont la croissance rapide lui confère un fort intérêt économique et pour lequel le génome a été entièrement séquencé ; offrant ainsi tous les outils de la biologie moléculaire. L'équipe MECA s'attache en particulier à étudier les processus d'acclimation des structures internes et externes des arbres soumis à des contraintes mécaniques externes. Ces processus de réponses, observés à différentes échelles, sont appelés thigmomorphogénèse.

Ce travail a pour but d'observer et d'analyser l'impact de sollicitations mécaniques contrôlées et répétées sur la thigmomorphogénèse aux l'échelle tissulaire et pariétale du bois afin d'appréhender les processus d'acclimation de la formation du bois et leurs déterminants moléculaires.



Figure 1 : Arbre soumis à de forts vents et présentant un port en drapeau



Figure 2 : Effet du vent sur la croissance longitudinale de *Medicago sativa*. Sur la zone centrale, le mouvement de plants de luzerne soumis au vent a été limité par un grillage. Une augmentation de près de 50 % de la croissance primaire a été observée (Mouliat et Combes, 2004).

I. Bibliographie

I.1. Réponses de croissances aux stimuli mécaniques

Dans la nature, les plantes sont soumises en permanence à des stimuli mécaniques comme la gravité ou les flexions dues au vent, à la charge de la neige, etc. La thigmomorphogénèse a été définie comme l'ensemble des réponses physiologiques, biochimiques et morphologiques des plantes aux perturbations mécaniques (Jaffe, 1973). Chez les arbres elle se caractérise par une réponse morphologique globale de la plante qui se traduit par une réduction de la croissance en hauteur et une augmentation de la croissance en diamètre de la tige (Telewski et Pruyn, 1998). Par la réduction de la surface de frottement au vent et la modification du rapport hauteur/diamètre de la tige, ces réponses semblent modifier le comportement mécanique de la plante et réduire le risque de rupture d'un axe par le vent (Pruyn *et al.*, 2000). La thigmomorphogénèse en association avec d'autres facteurs peut générer des ports en drapeau (figure 1) en conditions de vents violents et unidirectionnels (Telewski, 2006). Elle se traduit aussi par des modifications de la structure des tissus conducteurs et de soutien, et une diminution de la surface foliaire (Telewski et Pruyn, 1998), ainsi que par d'autres types de réponses physiologiques et moléculaires (Braam, 2005) (Kern *et al.*, 2005).

I.1.a. Réponse en croissance primaire

Chez les végétaux, le terme croissance « primaire » désigne la croissance en hauteur. Les travaux de Moulia et Combes (2004) menés en plein champ, ont montré une augmentation de près de 50% de la croissance primaire de la luzerne (*Medicago sativa*) lorsque la déformation de la tige due au vent est bloquée par rapport à des plants laissés libres de leurs mouvements (figure 2). Chez les arbres, il a été montré sur *Ulmus americana* que des séries de flexions bidirectionnelles avaient pour conséquence une diminution de la croissance primaire des arbres fléchis par rapport aux arbres témoins (Telewski et Pruyn, 1998). En laboratoire Braam,(2005) a montré sur *Arabidopsis thaliana* une inhibition de croissance primaire de la hampe florale suite à un régime de frottements réguliers (figure 3). Enfin, les travaux de Coutand *et al.* (2000) sur tomate (*Lycopersicon esculentum*) ont mis en évidence un arrêt d'élongation de la tige quelques minutes après une flexion de sa base ; arrêt de croissance qui persistait durant 65 minutes.



Figure 3 : Effet de touchés répétés sur la croissance longitudinale de hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*. Les plantes touchées deux fois par jour pendant plusieurs jours (à droite) présentent des hampes florales dont la croissance longitudinale a été diminuée par rapport aux plantes non sollicitées (à gauche) (Braam, 2005).

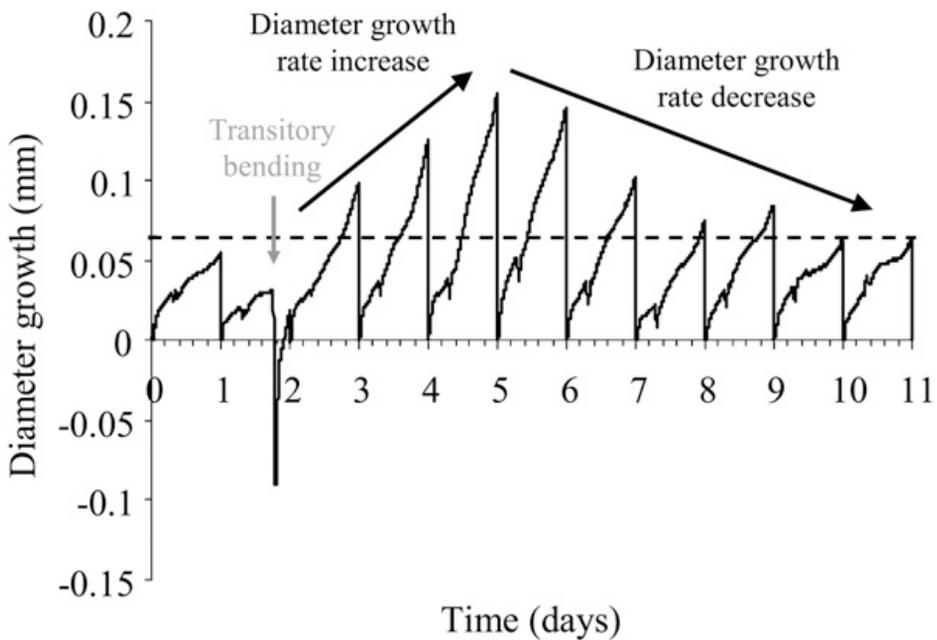


Figure 4: Effet d'une flexion unidirectionnelle et transitoire sur la croissance secondaire d'une tige de peuplier. Après la flexion le diamètre présente une croissance plus forte ; et ce durant sept jours après sollicitation. (Coutand *et al.*, 2009)

I.1.b. Réponse en croissance secondaire

La croissance secondaire est la croissance en diamètre des arbres. Telewski et Pruyn (1998) ont testé l'effet de flexions répétées (de 5 à 80 fois) sur le diamètre de tiges d'Orme d'Amérique (*Ulmus americana*). Leurs résultats montrent une augmentation de diamètre significative des arbres fléchis par rapport aux arbres témoins protégés de la déformation due au vent. Par contre, ils n'ont observé aucune différence de réponse en croissance secondaire entre les différents régimes de flexions. Pour la première fois, Martin *et al.*, (2009) ont étudié la réponse impulsionnelle en croissance secondaire de peupliers (*Populus tremula x alba*) sous sollicitations mécaniques d'amplitudes contrôlées. Ils ont ainsi mis en évidence une réponse locale, dans la zone fléchie, qui se traduisait par une augmentation rapide de la croissance secondaire journalière, avec un effet de rémanence pendant sept jours (figure 4).

I.1.c. Variables physiques perçues par la plante lors d'une flexion

Par une approche biomécanique, Coutand et Moulia (2000) ont proposé un modèle de mécanoperception qui stipule que la composante mécanique perçue par la plante est la somme des déformations subies lors de la flexion. Ces travaux portant sur la croissance longitudinale de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) ont montré une corrélation forte et positive entre la réponse physiologique (durée de réponse de croissance) et la somme des déformations subies dans le volume de la tige fléchie (figure 5).

Lors de la flexion d'une tige, chaque section de cette dernière est soumise à un moment de flexion qui entraîne sa rotation. Cette rotation de section induit sur une face une élongation longitudinale des tissus ($\Delta L > 0$) (zone en tension) et sur l'autre un raccourcissement ($\Delta L < 0$) (zone en compression) (figure 6). On définit alors la déformation mécanique ε comme l'allongement (ou le raccourcissement) relatif des tissus : $\varepsilon = \Delta L / L$ où L est la longueur initiale du tissu considéré. A l'interface des zones en compression et en tension se situe la ligne neutre qui ne subit aucune déformation. Le modèle de mécanoperception de Coutand et Moulia (2000), nommé S3M, stipule que chaque élément de tissu subissant une déformation émet un signal proportionnel à son volume et à l'amplitude de la déformation localement subie. Enfin, le modèle propose que la réponse globale que l'on observe (croissance, etc) soit proportionnelle à l'intégrale de ces signaux locaux.

Ce modèle de mécanoperception, validé sur la tomate, a ensuite été appliqué avec succès sur peuplier (Coutand *et al.*, 2009) dans le cadre de la réponse locale en croissance secondaire à des flexions. Cette étude a également montré une corrélation entre la croissance secondaire et la somme des déformations.

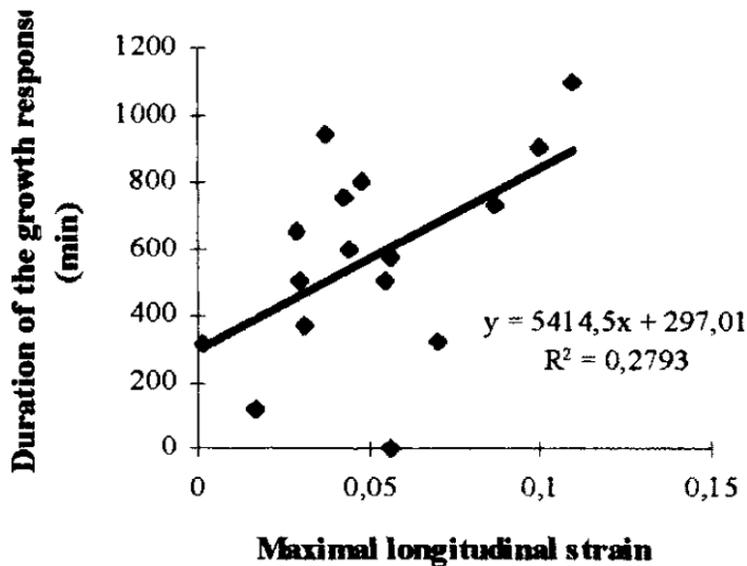


Figure 5: Impact de la déformation maximale subie lors de la flexion de la tige sur la durée de l'arrêt de croissance du peuplier. (Coutand et Moulia, 2000)

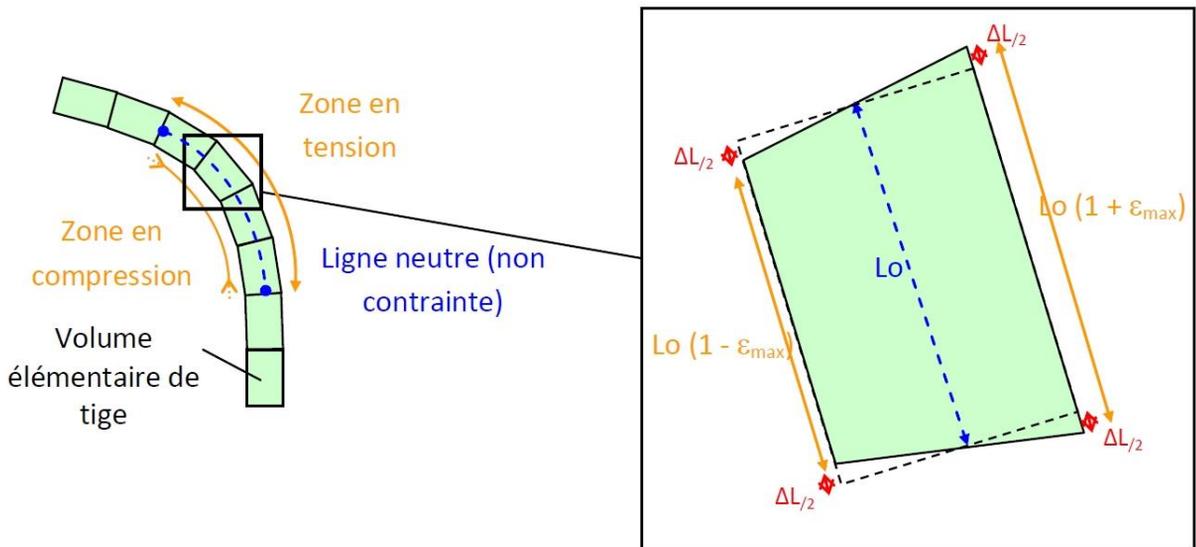


Figure 6 : Déformations locales dans une tige en flexion. L_0 est la longueur initiale du tissu ; ΔL est l'allongement ou le raccourcissement du tissu durant la flexion ; ϵ est l'allongement (raccourcissement) relatif, ou déformation du tissu. ϵ_{max} est la déformation maximum à la périphérie de la tige. La déformation $\epsilon = \Delta L / L_0$ s'exprime en %.

I.1.d. Réseau de perception des stimuli mécanique, et de transduction du signal

Les mécanismes de perception et de transduction ne sont pas connus. Mais des mécanismes hypothétiques ont été proposés. La perception du stimulus mécanique (mécanoperception) se réaliserait au niveau de chaque cellule, à l'interface cytosquelette-membrane plasmique paroi (CPMCW) (Telewski, 2006). Celle-ci crée une continuité structurale dans la cellule. La mécanoperception pourrait impliquer des canaux ioniques MS (mécanosensibles), qui sont des complexes de protéines membranaires. La force mécanique est directement transmise aux canaux par la bicouche lipidique dans lequel il se trouve. La tension accrue de la membrane conduit à un amincissement de celle-ci et à une augmentation des contraintes de tractions exercées. Ces variations induisent un changement de conformation du canal, ce qui favorise son état ouvert (Monshausen et Haswell, 2013). Un autre modèle « trapdoor », propose que la force mécanique soit transmise à un domaine du canal ionique par le biais d'autres structures telles que la paroi cellulaire ou le cytosquelette (Monshausen & Haswell, 2013).

En parallèle, les protéines transmembranaires kinase de type WAK (Wall-associated kinase) ont une conformation transmembranaire avec une région extra-cellulaire qui autorise leur liaison à la paroi et une région intra-cellulaire qui s'intègre dans les cascades de transduction de signal au niveau du cytoplasme (Monshausen et Gilroy, 2009). Ce positionnement particulier fait des WAKs des candidates pour la perception du stimulus mécanique. Enfin les WAKs sont surexprimées en cas de stress biotique et abiotique ce qui laisse penser qu'elles ont un rôle dans la transduction du signal (Monshausen et Gilroy, 2009).

La perception mécanique est suivie par des variations de gradients électrochimiques de part et d'autre des membranes plasmiques (Knight *et al.* 1992). Une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , et la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS (reactive oxygen species)), participent à la transduction du signal, et conduiraient à l'expression de gènes mécanosensibles (Telewski 2006).

Les hormones comme l'éthylène semblent également jouer un rôle dans la transduction du signal. Suite à la flexion de feuilles de *Vigna radiata*, Botella *et al.* (1995) ont observé une accumulation des ARNm de l'ACC synthase (enzyme clef de la production d'éthylène) après 10 minutes. Chez la tomate, le vent et le toucher déclenchent l'accumulation rapide (dès 10 minutes après le stress mécanique) et transitoire (l'expression des gènes

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

Figure 7 : Chronologie des réponses cellulaires et physiologiques observées suite à une sollicitation mécanique. D'après Telewski, 2006, complété par Martin, 2009. Les données utilisées pour établir cette chronologie sont issues d'études différentes, menées sur des espèces et des sollicitations mécanique différentes.

retrouve un niveau basal après 2 heures) de gènes codant différentes isoformes d'ACC synthase (Tatsuki et Mori, 1999).

Suite à la perception du stimulus mécanique et à sa transduction de nombreux gènes voient leur expression modifiée. En 2006, Telewski a proposé que les gènes *TOUCH* (codants pour des calmodulines, calmoduline like, xyloglucanetransglucosylase/hydrolase) étaient induits par l'augmentation en Ca²⁺ intracellulaire et par la présence d'espèces réactives de l'oxygène produites après la perception d'un stress mécanique.

Martin *et al.* (2009) ont identifié chez *Populus tremula x alba* un facteur de transcription à doigts de zinc, Pta-ZFP2, surexprimé rapidement (10 minutes), transitoirement et spécifiquement dans la zone fléchée de la tige. Ils ont aussi montré localement une relation forte entre l'expression de Pta-ZFP2 et la somme des déformations subies dans la zone fléchée, ce qui est cohérent avec le modèle de mécanoperception S3M. Pta-ZFP2 semble donc jouer un rôle dans la transduction du signal.

Finalement, il a été proposé une cinétique de la cascade des réponses moléculaires au cours de la transduction du signal mécanique (Telewski, 2006). A l'heure actuelle, il n'existe toutefois pas suffisamment de données pour comprendre les interactions entre l'ensemble de ces différents partenaires moléculaires (figure 7).

I.2. Effet des stimuli mécaniques sur la différenciation du bois

I.2.a. Formation et structure du bois

Le bois résulte d'un processus de division suivi d'une expansion et d'une maturation cellulaires. La division cellulaire s'opère au sein d'un méristème secondaire, le cambium. Les cellules issues du cambium se différencient en cellules du phloème secondaire si elles sont produites vers l'extérieur de la tige, et en cellules du xylème secondaire (le bois) si elles sont produites vers l'intérieur de la tige (Déjardin *et al.*, 2010). Après la division, les futures cellules de bois vont se différencier pendant une phase d'expansion cellulaire, responsable de la croissance en diamètre des arbres, et par la mise en place de plusieurs couches de parois primaire, puis secondaire, formées de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines qui leur confèrent les caractéristiques distinctives de leur type cellulaire. Après la mise en place d'une première paroi primaire, la paroi secondaire est déposée sous forme de deux couches (S1 et S2) auxquelles peut être parfois ajoutée une troisième couche S3. Les différentes couches de paroi déposées diffèrent de par leur composition chimique et leur structuration. Entre autre, chaque couche comporte des microfibrilles de cellulose cristallines particulièrement rigides

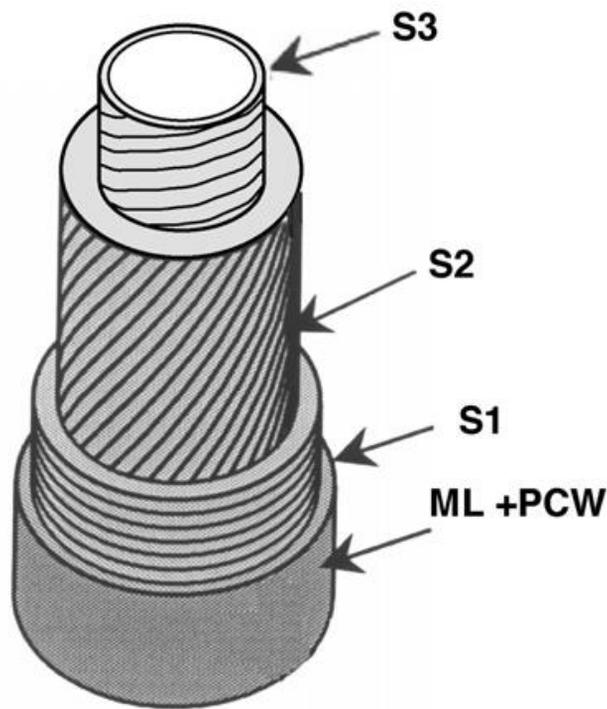


Figure 8: Schéma des différentes couches pariétales d'une fibre de bois. ML= Lamelle moyenne; PCW= Paroi primaire; S1,S2,S3= couches de la paroi secondaire (Déjardin et al., 2010). Les lignes représentent l'angle des microfibrilles de cellulose.

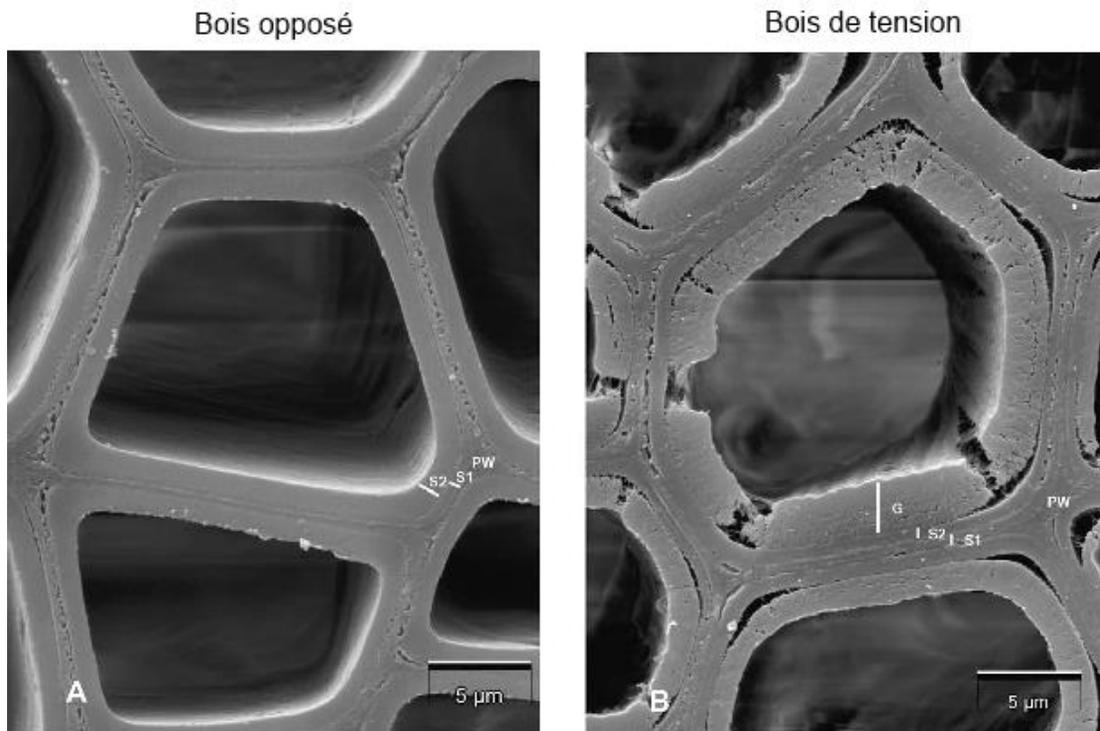


Figure 9: Photographie de microscopie électronique de fibres de bois de peuplier. (A) Zone de bois opposé (bois mise en place dans le même temps que le bois de tension, mais dans la zone de tige opposée). (B) Zone de bois de tension dont les cellules comportent une couche G (Pilate *et al.*, 2004). G = Couche G; S2 = couche S2 de la paroi secondaire; Pw = paroi primaire et lamelle moyenne.

dont l'organisation varie d'une couche à l'autre, et qui joue un rôle primordial sur les propriétés mécaniques de la cellule. (Déjardin *et al.*, 2010) (figure 8).

Gymnospermes et angiospermes montrent des structurations anatomiques de leurs bois très différentes. Le bois de gymnosperme est homoxylé, c'est-à-dire qu'il n'est formé que de trachéides qui jouent à la fois le rôle de conduction de sève et le rôle de soutien mécanique. Le bois des angiospermes, plus hétérogène, est dit hétéroxylé. Il possède quatre types cellulaires : les éléments de vaisseaux (servant principalement à la conduction de la sève brute), les fibres (ayant un rôle de soutien mécanique) et les cellules de parenchymes ligneux vertical et horizontal.

1.2.b. Caractéristiques du bois de réaction

Dans le cadre de tropismes liés à la gravité ou la recherche de lumière, l'arbre met en place un bois particulier dont les caractéristiques mécaniques permettent la réorientation des organes : c'est le bois de réaction (Pilate *et al.*, 2004 ; Matsuzaki *et al.*, 2007). Chez les gymnospermes, il se forme sur la face inférieure d'une tige inclinée qui tend à se redresser ; c'est le « bois de compression ». Le bois de compression se caractérise par des trachéides plus arrondies, plus petites et ayant une paroi secondaire plus épaisse que dans le bois témoin (Yamashita *et al.*, 2009). De plus la présence de couche G à été montrée dans les trachéides du bois de compression (Yamashita *et al.*, 2009). Chez les angiospermes, on le trouve sur la face supérieure de la tige inclinée : c'est le « bois de tension » (Pilate *et al.*, 2004). Chez les angiospermes, à l'échelle tissulaire, le bois de tension présente des fibres et des vaisseaux plus longs que le bois normal, ainsi qu'une diminution significative de la densité et de la taille des vaisseaux. Le bois de tension est également caractérisé par une augmentation de la proportion de fibres par rapport au bois normal. De plus, ces fibres possèdent une paroi plus épaisse que les fibres du bois normal (Pilate *et al.*, 2004, Jourez *et al.*, 2001). A l'échelle pariétale, on observe la mise en place d'une couche gélatineuse (couche G), riche en cellulose, au niveau de la couche S3 (figure 9) (Pilate *et al.*, 2004).

Le bois de réaction ne semble pas seulement être induit par un stimulus permanent comme le gravitropisme. Sur peuplier, du bois de tension peut être présent dans des tiges verticales d'arbres présentant une croissance rapide (Telewski, 2006). De même, Pitre *et al.* (2010) ont montré chez le peuplier qu'une forte fertilisation azotée pouvait modifier le processus de formation du bois de réaction ; en particulier la longueur des fibres et la composition chimique des parois qui présentent une plus forte proportion de cellulose et *a contrario* une plus faible proportion de lignine.

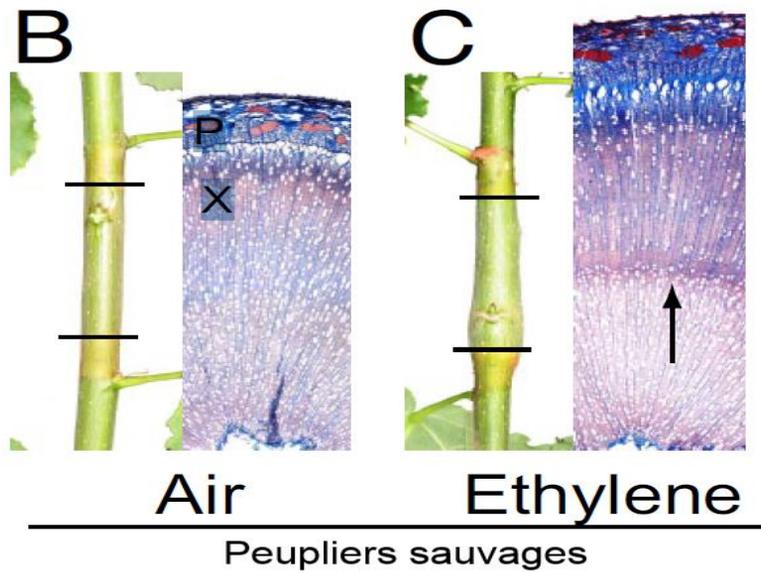


Figure 10: Effets d'un traitement exogène par l'éthylène sur la croissance et l'anatomie du xylème secondaire d'une tige de peuplier. L'éthylène stimule la croissance radiale des tiges. Le bois formé après traitement à l'éthylène (flèche) semble posséder moins de vaisseaux et plus de fibres (Love *et al.*, 2009). (P) désigne le phloème et (X) le xylème.

L'exposition de tiges à des flexions transitoires génère la mise en place d'un bois particulier ayant de nombreux points communs avec le bois de tension observé lors de stimuli gravitropiques. Ce bois particulier est appelé bois de flexion (Telewski, 1989). Des travaux menés sur *Abies fraseri* par Telewski (1989) ont montré que le bois mis en place après une série de flexions bidirectionnelle présente une densité moins importante que le bois d'arbres non sollicités. Plus récemment, Kern *et al.* (2005), dans le cadre d'une étude menée chez *Populus trichocarpa x deltoides*, ont montré une diminution de 38% de la couverture vasculaire (ratio surface de vaisseaux cumulée / surface de xylème) dans le bois d'arbres fléchis de manière répétées par rapport au bois d'arbres témoins. Dans cette même étude il a été montré que le diamètre moyen des vaisseaux d'arbres fléchis était diminué de 48%, passant de 45µm pour le bois normal à 23µm pour le bois de flexion. Le bois de flexion présenterait donc des ressemblances avec le bois de tension. Cependant, certains travaux semblent aussi montrer des différences, en particulier en terme de formation de couche G. Il reste là à noter un manque patent d'informations sur la description anatomique du bois de flexion produit sous sollicitations mécaniques temporaires.

1.2.c. Rôle des phytohormones dans la formation du bois de réaction

Dans la littérature, les études portant sur les molécules impliquées dans la formation du bois de tension se sont pour beaucoup intéressées aux hormones (éthylène, auxine, acide jasmonique, gibbérelline etc...). Sur l'ensemble des hormones, deux ont vu leurs rôles dans la mise en place du bois de tension bien décrits dans la littérature : l'éthylène et l'auxine.

L'éthylène est une phytohormone gazeuse impliquée dans les réponses physiologiques des plantes en situation de stress (Wang *et al.*, 2013), et intervient également dans la réponse à des sollicitations mécaniques (Braam, 2005 ; Telewski, 2006). Des travaux menés chez le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) ont montré que l'ajout exogène d'ethrel, une molécule métabolisée en éthylène par les plantes, induisait des changements morphologiques identiques à ceux obtenus en réponse à une sollicitation mécanique (Erner et Jaffe, 1983). En combinant l'utilisation de peupliers transgéniques insensibles à l'éthylène, des applications exogènes d'éthylène, de son précurseur l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) ou d'un inhibiteur de sa perception le MCP (1-MethylCycloPropene), Love *et al.* (2009) ont montré sur *Populus tremula x tremuloides* que l'éthylène pourrait être responsable de la mise en place d'une partie des caractéristiques du bois de tension modulant en particulier la densité de vaisseaux (figure 10).

L'auxine est une phytohormone synthétisée majoritairement à partir du tryptophane et joue un rôle important dans le développement des plantes. Dans la littérature il a été montré

que l'application d'antagonistes de l'auxine ou des inhibiteurs de transport de l'auxine à la fois sur les tiges de gymnospermes et d'angiospermes ligneux a conduit à l'hypothèse que l'auxine jouerait un rôle dans la formation du bois de réaction. Cette hypothèse laisserait donc à penser que des quantités accrues d'auxine pourraient induire la formation de bois de compression chez les gymnospermes et que, à l'inverse, une carence en auxine serait nécessaire pour la mise en place de bois de tension chez les angiospermes (Du et Yamamoto, 2007 ; Felten et Sundberg, 2013). Une expérience menée sur *Populus tremula x tremuloides* (Moyle *et al.*, 2002) a montré que les gènes *PttIAA1* et *PttIAA2* codant des répresseurs transcriptionnels de type AUX/IAA présentent une augmentation de leur expression dans le bois de tension formé après une inclinaison de 6h par rapport à des témoins non inclinés. Une étude (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006) a également montré que d'autres gènes liés à l'homéostasie et à la signalisation de l'auxine voient leur expression modifiée dans le bois de tension par rapport au bois opposé d'une tige arquée de *Populus tremuloides*. L'auxine semble donc jouer un rôle dans la différenciation du bois de réaction.

1.2.e. Acteurs moléculaires de la mise en place du bois de tension

Les caractéristiques biochimiques et anatomiques des bois de réaction ont été étudiées chez de nombreuses espèces. En revanche, les mécanismes moléculaires contrôlant leur mise en place sont encore mal connus. Des approches à grande échelle basées sur l'analyse d'ESTs (Déjardin *et al.*, 2004, sur *Populus tremula x P. alba*) ou de résultats de micro-array (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006, sur *Populus tremula x P. tremuloides* ; Jin *et al.*, 2011, sur *Liriodendron tulipifera* ; Paux *et al.*, 2005, sur *Eucalyptus globulus*) ont toutefois permis d'identifier les principales catégories d'acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la mise en place du bois de tension. Ces études ont été menées sur des espèces différentes et ont mis en œuvre des temps d'induction du bois de tension différents. Elles sont donc difficilement comparables. Pourtant trois principales catégories de gènes ressortent régulièrement de ces différentes études : les gènes liés à la synthèse des parois et leur modification, les gènes codant des facteurs de transcription et des gènes liés à la biosynthèse des hormones et à leur signalisation.

Parmi les gènes les plus fortement surexprimés dans le bois de tension par rapport au bois normal, certains codent des protéines appartenant à la famille des AGPs (arabinogalactan proteins), et notamment aux AGPs de type FLA (Fasciclin-like arabinogalactan-protein) (Déjardin *et al.*, 2004 ; Lafarguette *et al.*, 2004 ; Andersson-Gunneras *et al.*, 2006). Les AGPs sont des protéines glycosylées localisées dans la paroi, la membrane plasmique ou bien encore l'apoplasme. Chez le peuplier, des analyses immunohistochimiques montrent que des

AGPs sont exprimées sur la face interne de la couche G des fibres (Lafarguette *et al.*, 2004). Parmi les AGPs, les FLAs ont la particularité de posséder un domaine présentant des similarités avec les molécules d'adhésion cellulaire Fasciclin de la drosophile (Lafarguette *et al.*, 2004). Leur rôle dans la formation du bois reste inconnu. Un ensemble de données montrant une association ou une corrélation entre des modifications de l'expression de gènes codant des FLAs, une modification des teneurs en cellulose du bois, des modifications des caractéristiques anatomiques du bois ou de ses propriétés biomécaniques laisse toutefois penser que ces protéines pourraient être impliquées dans le contrôle de ces paramètres (MacMillan *et al.*, 2010). L'ensemble de ces éléments suggère donc l'importance de ces protéines dans la mise en place du bois de tension.

Les études d'Andersson-Gunneras *et al.* (2006) révèlent également la surexpression de gènes codant des protéines de type LIM (LIN11/ISL-1/MEC-3) dans le bois de tension par rapport au bois témoin. Plus récemment, Arnaud *et al.* (2012) ont montré que, chez des plants de *Populus tremula x alba* ayant mis en place du bois de tension suite à un stress gravitropique, les gènes *PtXLIM1a*, *PtXLIM1b*, *PtWLIM1a*, *PtWLIM1b* et *PtPLIM2a* sont globalement surexprimés dans le bois de tension par rapport au bois témoin. Chez les eucaryotes, les protéines LIM s'accumulent à la fois dans le noyau, où elles peuvent agir en tant que facteur de transcription, et dans le cytoplasme où elles s'associent avec les filaments d'actine du cytosquelette. Kawaoka *et al.* (2000) ont montré sur des plants transgéniques de tabac que ces protéines LIM joueraient un rôle de régulateur transcriptionnel de gènes de biosynthèse de la lignine. Plus récemment, il a été mis en évidence qu'en liant les microfilaments d'actine, elles favoriseraient la formation et la stabilisation de câbles d'actine (Thomas *et al.*, 2006 ; Papuga *et al.*, 2010), suggérant une implication de ces protéines dans la perception ou la transduction de la perturbation mécanique dans le bois de tension (Arnaud *et al.*, 2012).

I.3. Objectifs et approche adoptée

Dans la littérature, la question du bois de tension formé pendant un stress gravitropique est documentée, que ce soit au niveau de la caractérisation anatomique à l'échelle tissulaire (densité et taille des vaisseaux, etc...) ou à l'échelle pariétale (composition de la paroi, présence de couche G, etc...). Malgré quelques approches transcriptomiques à grandes échelles (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006 ; Lafarguette *et al.*, 2004 ; Jin *et al.*, 2011), les mécanismes moléculaires régissant la formation du bois de tension restent encore à identifier. *A contrario*, la structure anatomique du bois de flexion mis en place dans des tiges d'arbres sous contraintes mécaniques transitoires est assez mal connue. Les principales études sur ce sujet se résument à celles de Telewski (1989), Pruyn *et al.* (2000) et Kern *et al.* (2005). Elles abordent l'impact des stimulations mécaniques sur les croissances en hauteur et en diamètre, mais donnent peu d'informations sur les caractéristiques anatomiques du bois formé. D'autre part, ces études portent sur un bois de flexion formé par l'application de flexions multidirectionnelles et souvent d'amplitude peu contrôlée. Enfin, la structure du bois de flexion à l'échelle pariétale ainsi que les déterminants moléculaires de sa formation ne sont jamais abordés.

Les principaux objectifs de ce stage étaient de compléter au mieux les lacunes de la littérature sur la caractérisation anatomique du bois de flexion et d'aborder le volet moléculaire de sa formation. Le premier objectif était est d'estimer l'impact de flexions répétées sur le fonctionnement quantitatif et qualitatif du cambium, siège de la production du bois. Nous avons travaillé sur de jeunes peupliers (*Populus tremula x alba*). Des tiges ont été sollicitées par des flexions répétées d'amplitudes contrôlées pendant plusieurs semaines afin de stimuler la formation de bois de flexion. L'impact sur l'accroissement en diamètre des tiges stimulées pendant plusieurs semaines a été estimé par comparaison avec des plants témoins. L'effet dose a été abordé par modulation de la fréquence des stimulations. La structure anatomique du bois de flexion a été analysée sur des coupes cytologiques à l'échelle tissulaire (densité et tailles de vaisseaux) et pariétale (épaisseur de paroi de fibre et de couche G) et comparée à un bois « normal », formé sans stimulation mécanique. Nous avons aussi abordé les gradients de structures entre les différents compartiments d'une section de tige afin de mettre en évidence des différences de réponses selon que les tissus étaient stimulés en tension (allongement des cellules) ou compression (raccourcissement des cellules) lors de la flexion.



Figure 11: Disposition des arbres dans la chambre de culture. Les arbres ont été maintenus par leur tige à l'aide de colliers fixés sur une traverse positionnée au-dessus du bac. Les robots de flexions sont positionnés face aux 8 arbres fléchis. Chaque robot est connecté à un automate qui impose les horaires des stimulations mécaniques.

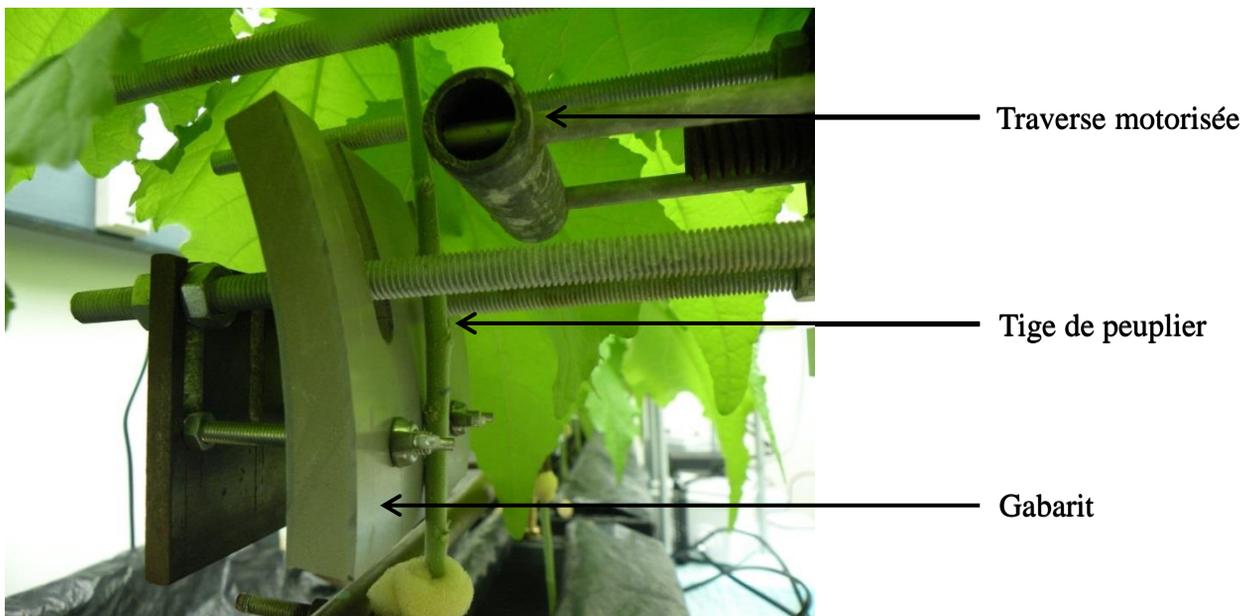


Figure 12: Dispositif de flexion et gabarit utilisé lors des expérimentations. La traverse motorisée permet d'appliquer la tige sur le gabarit. Le rayon de courbure du gabarit permet de contrôler le niveau de déformation maximale (ici de l'ordre de 1,5%).

Le second objectif de ce travail était déborder le volet moléculaire de la formation du bois de flexion. Par une approche de type « gène candidat », nous avons cherché à mettre en relation, à un niveau spatial très localisé, les réponses de fonctionnement cambial avec l'expression de gènes responsables de la différenciation cellulaire. Notre choix s'est porté sur le gène *PtXLIM1a* (famille des gènes *LIM*) connu pour être surexprimé dans le bois de tension. Nous avons donc estimé l'impact du traitement de sollicitations mécaniques répétées sur l'expression relative de ce gène par Q-PCR. Les déformations dans la tige fléchie n'étant pas homogènes, ces investigations ont été menées à une échelle locale afin de garantir sur nos échantillons, une homogénéité de la déformation subie par le tissu considéré.

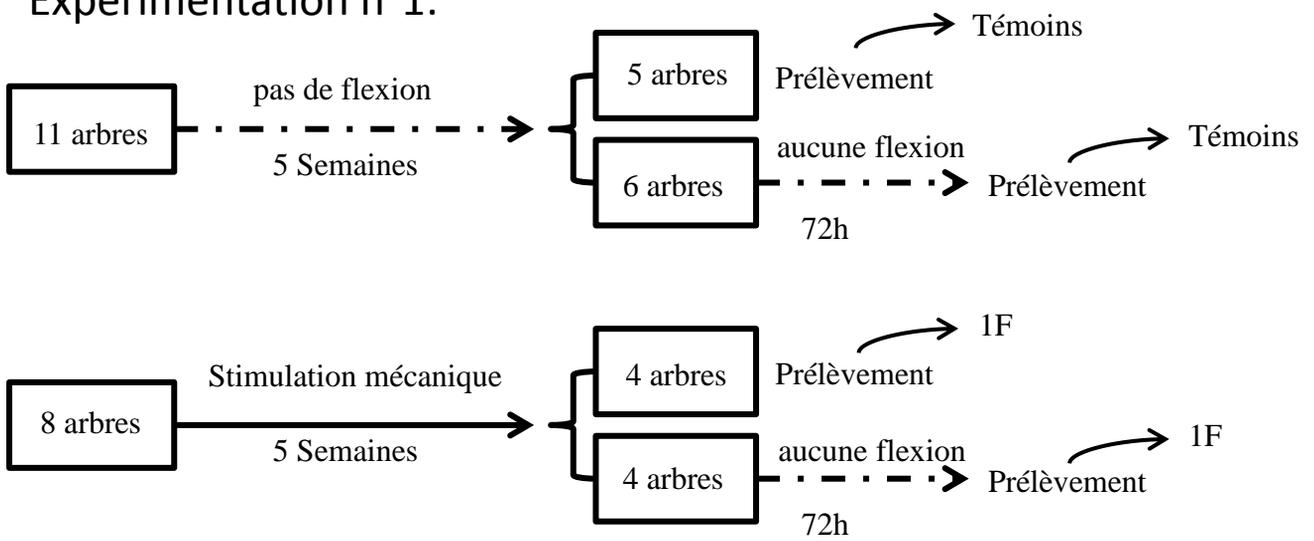
II. Matériels et Méthodes

Deux expérimentations complémentaires ont été réalisées. La première avait pour objectif d'observer et de quantifier la mise en place de bois de flexion associées suite à un régime modéré de flexions répétées. La seconde expérimentation avait pour but (1) de confirmer cette première série de résultats, (2) d'investiguer l'effet « dose » sur les différents paramètres anatomiques étudiés en augmentant la fréquence et le nombre de sollicitations et (3) d'identifier des acteurs moléculaires de la mise en place du bois de flexion.

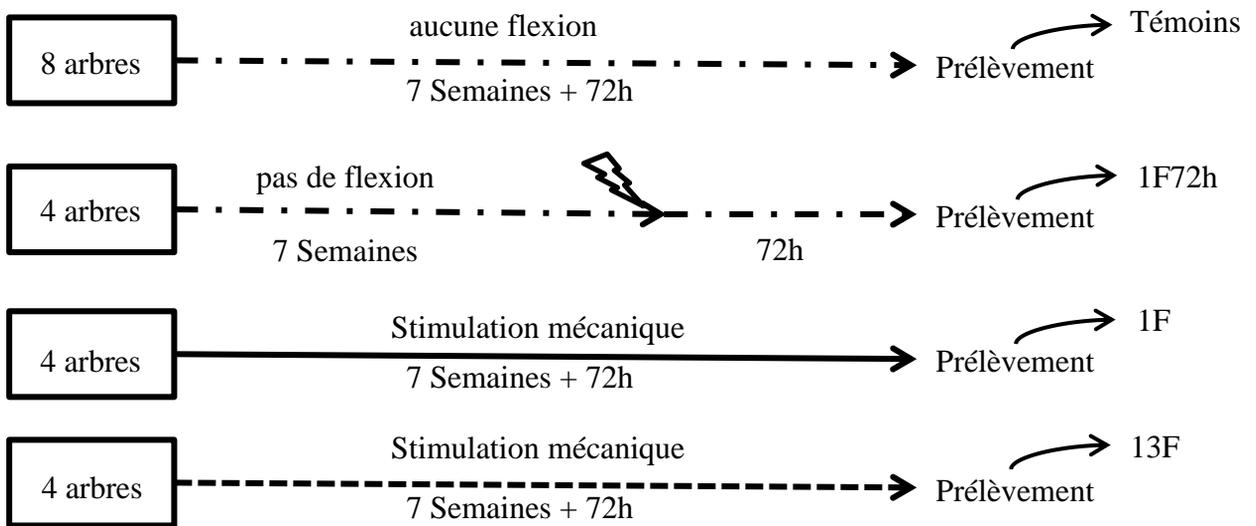
II.1. Matériel végétal

Les peupliers utilisés dans cette étude (*Populus tremula x alba*, clone 717-1B4) étaient issus de multiplication par microbouturage sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Après une phase d'acclimatation de deux semaines, de jeunes plants de taille homogène (environ 40 cm) ont été sélectionnés pour leur homogénéité puis cultivés en hydroponie dans une solution nutritive dans une chambre climatique à 22°C, avec une humidité relative d'environ 60%, un éclairage de 60 à 100 μmol de photons et un rythme journalier de 16 h de jour et 8 h de nuit. Les arbres ont été maintenus par leur tige à l'aide de colliers (positionnés à 11 cm au-dessus du collet) fixés sur une traverse positionnée au-dessus du bac de solution hydroponique (figure 11).

Expérimentation n°1:



Expérimentation n°2:



Légende

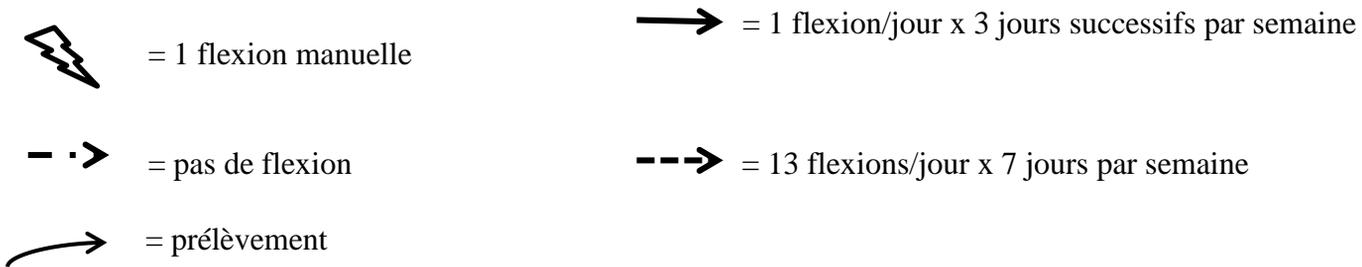


Figure 13: Protocole expérimental des deux expériences. Les codes « Témoins », « 1F », « 13F » et « 1F72h » représentent respectivement les traitements: 0 flexion; 1 flexions par jour pendant 3 jours successifs par semaine; 13 flexions par jour tout les jours et 1 unique flexion 72h avant le prélèvement.

II.2. Application de flexions contrôlées sur les tiges

II.2.a. Principe de flexion de tige par robots automatisés

Le segment de tige de 60 mm situé au-dessus du point d'attache de l'arbre a été fléchi au moyen d'un système de flexion automatisé (figure 12). Il consiste en une traverse motorisée permettant d'appliquer la tige sur un gabarit en PVC de rayon de courbure constant. La flexion d'une tige induit un champ de déformations longitudinales dans la section dont le maximum (ϵ_{\max}) peut être calculé géométriquement au moyen de la formule suivante: $\epsilon_{\max} = R/(\rho+R)$ (où R = rayon de la tige et ρ = rayon de courbure du gabarit). Ainsi, nous avons choisi les rayons de courbure des gabarits afin d'appliquer à toutes les tiges un niveau de déformation maximum de l'ordre de 1.5% ; valeur qui permet d'éviter des endommagements irréversibles. Ce dispositif a été utilisé afin de mener deux expérimentations distinctes.

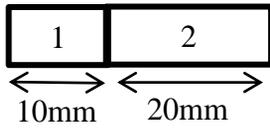
II.2.b. Expérimentation n°1

Huit arbres ont été sollicités durant 5 semaines à raison d'une fois par jour pendant trois jours (lundi, mardi et mercredi) suivis de quatre jours sans flexion (protocole issu de Martin *et al.*, 2009). Huit autres étaient des témoins. Les flexions ont été réalisées par les robots automatisés. Deux jours ont été nécessaires pour l'ensemble des prélèvements, cinq arbres témoins et quatre arbres fléchis une fois par jour pendant trois jours (1F) ont été prélevés le premier jour, six arbres témoins et quatre arbres 1F ont été prélevés 72h plus tard (figure 13).

II.2.c. Expérimentation n°2

Deux lots de quatre arbres ont été fléchis régulièrement selon deux régimes de flexion différents. 8 autres arbres étaient des témoins. Le régime de flexion appliqué sur le premier lot (4 arbres) était similaire à celui de l'expérimentation n°1 ; à savoir une flexion par jour, 3 jours successifs par semaine (1F). Le protocole appliqué sur le second lot (4 arbres) impliquait 13 flexions par jour à intervalle d'une heure, tous les jours de la semaine (noté 13F). Ces protocoles ont été appliqués durant 7 semaines. A la fin du traitement, et dans le but de distinguer les niveaux d'expression de gènes induits par la dernière flexion de ceux induits par l'accumulation des flexions, une dernière flexion a été appliquée sur 4 arbres non-fléchis régulièrement 72h avant le prélèvement (traitement noté 1F72h) (figure 13).

Expérimentation n°1



Expérimentation n°2

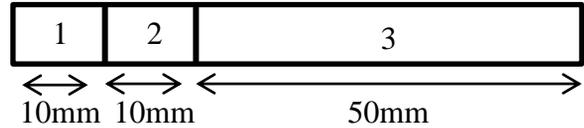


Figure 14: Zones de prélèvement sur les portions de tiges ayant subi les déformations maximales (ou portion équivalente pour les arbres témoins). 1= zone prélevée pour mesures anatomiques (coupes cytologiques de 2 μ m d'épaisseur); 2= zone prélevée pour mesures anatomiques (coupes cytologiques de 18 μ m d'épaisseur); 3= zone prélevée pour les analyses de biologie moléculaire. Dessin a modifier car pas de BM en manip 1

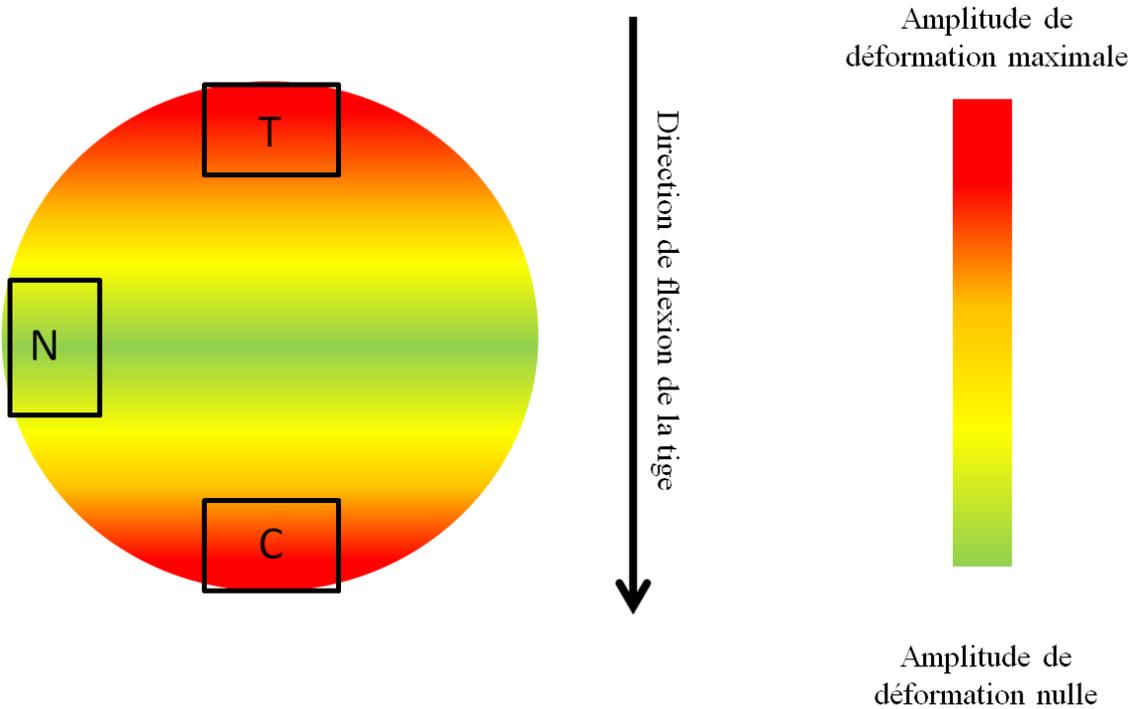


Figure 15: Plan d'échantillonnage pour les analyses cytologiques et moléculaires au sein d'une section de tige. Le code couleur représente la distribution spatiale des déformations longitudinales subies lors d'une flexion unidirectionnelle. La zone T est la partie en tension maximum; la zone N correspond à la ligne neutre; la zone C est la partie en compression maximum. La flèche indique le sens de la flexion. L'échelle des couleurs représente le niveau absolu des déformations.

II.3. Mesures de croissances primaires et secondaires

Les diamètres des tiges ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse 13 cm au-dessus du collet, c'est-à-dire, pour les arbres stimulés, à mi-hauteur de la zone de sollicitations. Les mesures ont été réalisées lors de l'installation en chambre, lors de la mise en place des robots et enfin lors du prélèvement. La hauteur des arbres a été mesurée lors de l'installation des plants ainsi que la veille du prélèvement en évitant tout contact avec les plants.

II.4. Prélèvement

II.4.a. Expérimentation n°1

Un segment de tige de 30 mm, correspondant à la zone fléchie (ou équivalente pour les arbres témoins) a été prélevé. Celui-ci a été séparé en 2 tronçons distincts. Un tronçon de 20 mm était destiné aux coupes cytologiques transversales de 18 μm d'épaisseur pour une caractérisation du xylème à l'échelle tissulaire. Un deuxième tronçon de 10 mm était destiné à des coupes transversales de 2 μm d'épaisseur pour une caractérisation du xylème à l'échelle pariétale (figure 14).

II.4.b. Expérimentation n°2

Un segment de tige de 70 mm, correspondant à la zone fléchie de la tige (ou zone équivalente pour les arbres témoins) a été prélevé. Un tronçon de 50 mm était destiné aux analyses moléculaires. Un tronçon de 10 mm était destiné à des coupes transversales de 2 μm d'épaisseur pour une caractérisation du xylème à l'échelle pariétale (figure 14). Un dernier tronçon de 10 mm était destiné à des coupes transversales de 18 μm d'épaisseur pour une caractérisation du xylème à l'échelle tissulaire.

II.5. Analyses cytologiques

II.5.a. Observations anatomiques à l'échelle tissulaire

Pour les deux expérimentations, des analyses cytologiques à l'échelle tissulaire ont été effectuées. Les tronçons de tige de 20 mm ont été imprégnés sous vide au PEG (Polyéthylène glycol) en passant par trois bains successifs de trois heures minimum chacun, et de concentrations croissantes en PEG (30%, 50% et 100%). Des coupes transversales de tige de

18 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome à rotation (Leica RM2165). Un protocole de double coloration Safranine / Bleu Astra a été appliqué afin d'identifier la lignine (colorée en rose) et la cellulose (colorée en bleu) avant le montage des coupes dans un fixateur (EUKIT) entre lame et lamelle. Des images des coupes ont été acquises au grossissement x10 grâce à un microscope (Leica Laborlux K). Sur chaque section, 3 zones d'intérêt ont été sélectionnées : la zone sollicitée en tension (notée « T » dans la suite du texte) lors de la flexion, la zone sollicitée en compression par la flexion (notée « C ») et la zone située autour de la ligne neutre n'ayant subi aucune déformation (notée « N ») (figure 15). La densité de vaisseaux, le diamètre des vaisseaux et la moyenne de leurs surfaces ont été mesurés par analyse d'image, dans chaque zone de bois formé durant la période de sollicitation à l'aide du logiciel ImageJ et de macros spécifiquement développées au laboratoire.

II.5.b. Caractérisation cytologique à l'échelle pariétale

Les mesures anatomiques à l'échelle pariétale nécessitaient une résolution spatiale accrue et donc la réalisation de coupes de 2µm d'épaisseur. Les tronçons de tige de 10 mm ont été inclus dans la résine LR-White (Sigma-Aldrich USA), puis les coupes transversales ont été réalisées avec un microtome à couteaux de verre (Reichert Austria Om U2). Comme pour les coupes de 18 µm d'épaisseur, un protocole de double coloration Safranine/Bleu Astra a été appliqué pour distinguer la cellulose de la lignine avant le montage des coupes dans l'EUKIT entre lame et lamelle. Des images des coupes ont été réalisées au grossissement x100 à l'aide d'un microscope optique (Axiostop 40, Zeiss) équipé d'une caméra (AxioCam ICc5, Zeiss). Les épaisseurs des parois de fibres ainsi que les épaisseurs de couche G ont été mesurées spécifiquement dans la zone tendue (T) à l'aide du logiciel ImageJ et de macros spécifiquement développées au laboratoire. Pour les deux types de paramètre (épaisseur de paroi et de couche G) 6 mesures par cellule sur environ 60 cellules par coupe ont été réalisées dans le but d'obtenir un nombre suffisant de données pour éviter un impact trop important de l'imprécision des mesures due à la résolution des images analysées.

II.6. Réponses moléculaires

L'écorce des zones sollicitées respectivement en tension et en compression ainsi que celle de la partie ne subissant aucunes déformations (ligne neutre) a été immédiatement prélevée et stockée dans l'azote liquide. Après écorçage complet du tronçon de tige, et marquage de la zone sollicitée en tension, l'échantillon de xylème a été immédiatement stocké

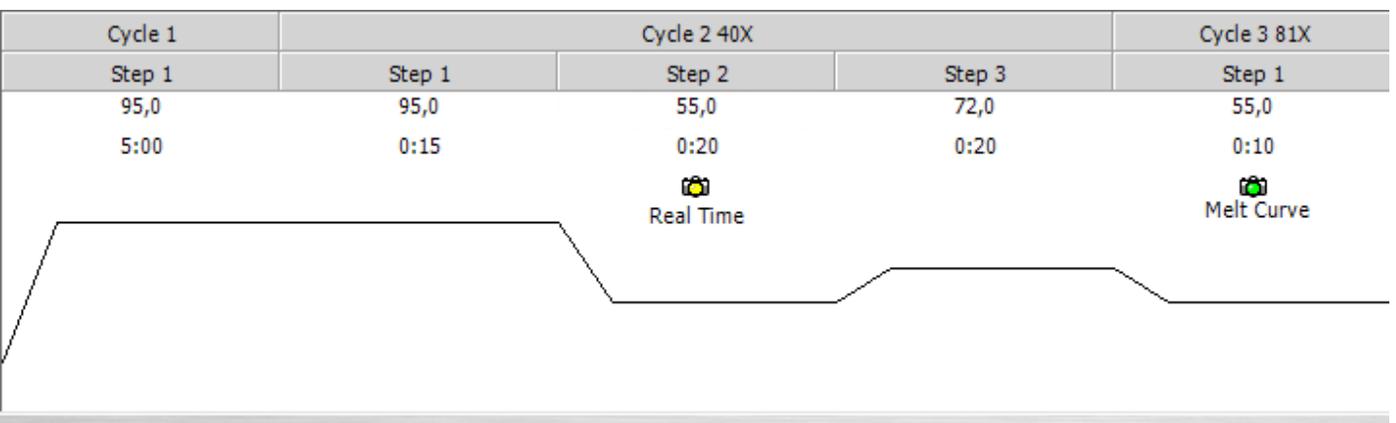


Figure 16: Protocole d'amplification de *WLIM* et *EF1 α* lors des Q-PCR. Les températures appliquées sont de 95°C pour l'étape 1 (étape de dénaturation de l'ADN) du cycle 1 et 2, 55°C pour l'étape 2 (étape d'hybridation des amorces sur l'ADN) et 72°C pour l'étape 3 (étape d'élongation) du deuxième cycle et 55°C pour l'étape 1 du troisième cycle (Melt Curve). La durée du premier cycle est de 5 minutes. La durée du second cycle est de 55 secondes (respectivement 15s, 20s et 20s pour les étapes 1, 2 et 3). La durée du troisième cycle est de 10 secondes (image issue du logiciel BioRad IQ5).

Gènes	TM (°C)	Amorce sens	Amorce anti-sens
WLIM	55-56	5',AGGCTGCGACAAGACTGTCTATCCG ₃ ,	5',GCTGACGACTGGATTTTTCTCA ₃ ,
EF1 α	55	5',TGAGATGCACCACGAAGCTC ₃ ,	5',CCAACATTGTCACCAGGAAGTG ₃ ,

Tableau 1 : Séquences et températures d'hybridation (TM) des amorces utilisées pour les expériences de Q-PCR.

dans l'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C . Dans un deuxième temps les tronçons ont été redécoupés afin de distinguer trois zones d'intérêt dans le bois mis en place pendant les sollicitations : la zone sollicitée en tension par la flexion (T), la zone sollicitée en compression (C) et la zone située autour de la ligne neutre n'ayant subi aucune déformation (N) (figure 15).

II.6.a. Extraction d'ARNs

Après broyage dans l'azote liquide des échantillons prélevés, les analyses d'expressions géniques ont été effectuées à partir d'une extraction d'ARN selon la méthode CTAB utilisant le LiCl pour précipiter spécifiquement les ARNs (Chang *et al.*, 1993). Ces ARNs sont ensuite dosés et leur pureté estimée au moyen d'un NanoDrop (modèle ND-1000). L'absence de dégradation des ARNs a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, à raison de $0,5\mu\text{g}$ d'ARN par échantillon déposé.

II.6.b. Synthèse d'ADNc

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir du kit Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen). 1mg d'ARNs totaux a été incubé en présence d'oligodéoxythymines ($50\mu\text{M}$) et de désoxyribonucléotides (10mM). Après dénaturation des ARNs pendant 5 minutes à 65°C , la synthèse d'ADNc a été réalisée en incubant les ARNs en présence de 50U de reverse transcriptase pendant 1 heure à 50°C . La réaction a été stoppée par une étape à 85°C durant 5 minutes. Les fragments d'ARNs totaux ont été éliminés grâce à une incubation à 37°C pendant 20 minutes en présence de 2U de RNase. La qualité des ADNc a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

II.6.c. PCR Quantitative relative

Pour chaque gène étudié $2\mu\text{L}$ des ADNc dilués au 40ème ont été ajoutés à un Mix 2X (MESA GREEN qPCR MasterMix plus, Eurogentec) contenant des dNTPs, des polymérases et le fluorochrome (SybrGreen), et au couple d'amorces sens/antisens 200nM final (Tableau 1). Le volume final de la réaction était de $15\mu\text{L}$.

L'amplification a été réalisée grâce au thermocycleur Biorad-iQ5 selon le protocole décrit en figure 16. Le protocole est composé de 3 cycles distincts comprenant chacun une ou plusieurs étapes. Le premier cycle est composé d'une seule étape à 95°C d'une durée de 5 minutes ayant pour but de dénaturer les ADNc (l'ADN passe de l'état double brin). Le deuxième cycle est répété 40 fois et comprend 3 étapes, la première (95°C pendant 15 secondes) a pour but de dénaturer l'ADN, la seconde étape (55°C pendant 20 secondes) est

celle durant laquelle les amorces s'hybrident à l'ADN, enfin la troisième étape (72°C pendant 20 secondes) a pour but de permettre l'élongation des double brin d'ADN néoformés durant l'étape précédente. Le troisième cycle (répété 81 fois) est composé d'une étape (55°C pendant 10 secondes) permettant à l'appareil de tracer la Melt Curve (courbe représentant la vitesse de dissociation des ADN double brin présents dans les puits) servant à vérifier la spécificité des amorces.

II.7. Analyses statistiques

Des tests statistiques ont été réalisés sur les différents jeux de données obtenus lors des expérimentations.

Tous les jeux de données visant à statuer sur le caractère significatif des différences de moyennes observées ont été traités à l'aide de tests de student (T.test) bilatéraux avec un risque α de 5%. Les tests ont été réalisés sur le logiciel Microsoft Excel 2010.

III. Résultats

Dans les expériences n°1 et n°2 plusieurs traitements ont été appliqués. Par souci de clarté, des codes ont été utilisés pour nommer les différents traitements. Le traitement des expériences n°1 et n°2 consistant à fléchir la tige une seule fois par jour pendant trois jours successifs par semaine sera noté 1F. Le traitement de l'expérience n°2 consistant à fléchir la tige treize fois par jour tous les jours sera noté 13F. Les arbres fléchis une seule fois 72 heures avant le prélèvement seront notés 1F72h. Enfin les arbres n'ayant subi aucune flexion seront nommés « témoins ».

III.1. Effets de flexions répétées sur la croissance de tiges de peuplier

De nombreuses études ont montré les effets de flexions uniques et unidirectionnelles (Coutand *et al.*, 2000, chez la tomate ; Coutand *et al.*, 2009, chez le peuplier) ou répétées et multidirectionnelles (Telewski et Pruyn, 1998, chez l'Orme d'Amérique) sur les croissances primaire et secondaire de tiges. Dans le dernier cas, les flexions étaient d'amplitude non contrôlée. Afin d'étudier les effets de différents régimes de flexions contrôlées, unidirectionnelles et répétées sur la croissance de tiges de peuplier, des mesures de hauteurs et de diamètres ont été réalisées, et les croissances primaire et secondaire ont été estimées.

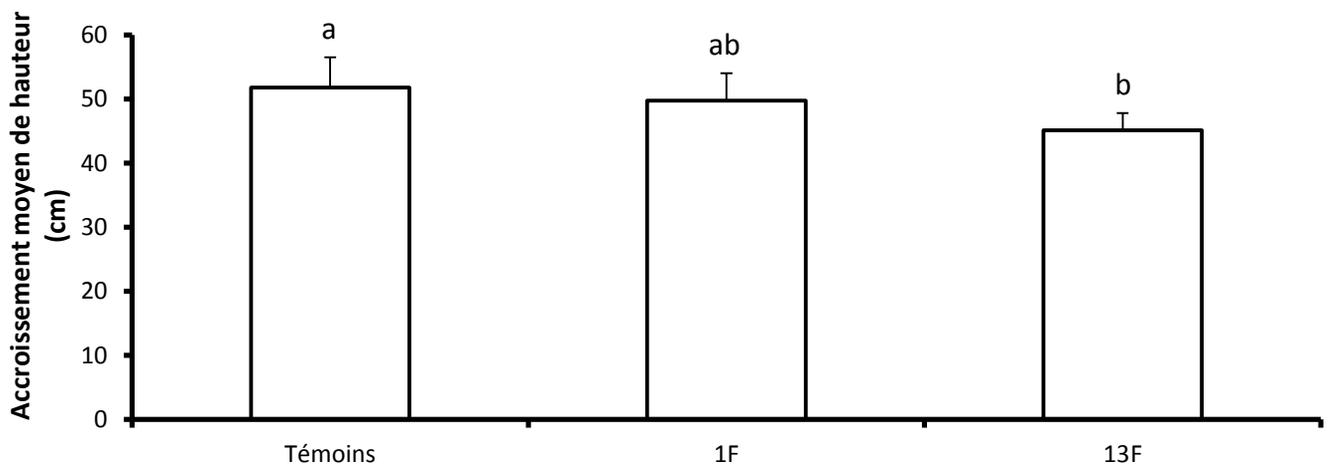


Figure 17: Effet de différents régimes de flexion sur la croissance primaire de tiges de peuplier. L'élongation de la tige a été évaluée par mesures de la longueur totale de la tige avant et pendant la période de stimulation mécanique (7 semaines d'intervalle). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de 12 arbres témoins et, pour chaque régime de flexion, 4 arbres fléchis. Les lettres a et b représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$).

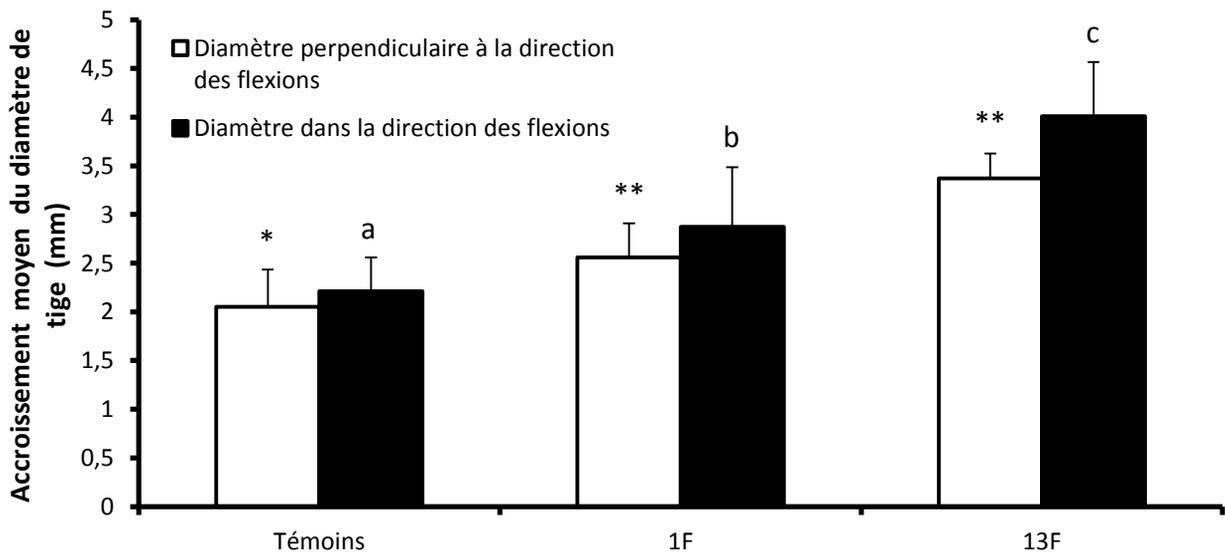


Figure 18: Effet de différents régimes de flexion sur la croissance en diamètre de tiges de peuplier. L'accroissement du diamètre de la tige a été évalué par deux mesures effectuées avant et après la période de stimulation mécanique (7 semaines d'intervalle). Le diamètre a été évalué à l'aide d'un pied à coulisse, dans la portion de tige subissant les déformations. Les mesures ont été réalisées dans la direction des flexions (■) ainsi que dans la direction perpendiculaire (□). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de 12 arbres pour les témoins et, pour chaque régime de flexion, 4 arbres fléchis. Les lettres a, b et c représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$) pour la comparaison de la croissance des diamètres dans la direction des flexions. Les symboles * et ** représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$) pour la comparaison de la croissance des diamètres perpendiculaires à la direction des flexions.

III.1.a. Impacts des flexions de tiges sur la croissance primaire

Les mesures de hauteur ont été effectuées sur les vingt arbres de l'expérimentation n°2, à l'installation des arbres et trois jours avant le prélèvement (soit 7 semaines de croissance entre les deux mesures) à l'aide d'un mètre. L'accroissement moyen en hauteur (ΔH) sur 7 semaines des arbres témoins et stimulés selon les deux modalités de sollicitation a été estimé. On observe une croissance primaire statistiquement ($p < 0,05$) plus faible pour les arbres 13F par rapport aux arbres témoins ($\Delta H = 45$ cm pour les arbres 13F contre $\Delta H = 52$ cm pour les témoins) (figure 17). La croissance des arbres 1F semble être intermédiaire aux deux autres groupes ($\Delta H = 49,7$ cm), mais aucune différence statistique ne ressort par rapport aux arbres témoins et aux arbres 13F.

III.1.b. Impacts des flexions de tiges sur la croissance secondaire

Pour estimer l'impact des stimulations mécaniques sur la croissance secondaire des tiges, leur diamètre (D_t) a été mesuré à l'installation des arbres et trois jours avant le prélèvement (soit 7 semaines de croissance entre les deux mesures) dans la zone de tige fléchie. Les mesures ont été réalisées dans la direction des flexions ainsi que dans la direction perpendiculaire aux flexions à l'aide d'un pied à coulisse. A partir des diamètres mesurés dans les deux directions l'ovalisation des tiges a été calculée. Cette ovalisation est due à une croissance secondaire plus importante dans la direction de flexion de la tige par rapport la croissance secondaire dans la direction perpendiculaire à la flexion. L'ovalisation des tiges des arbres 13F ressort statistiquement ($p < 0,05$) (rapport des deux diamètres : 1,0928 pour les 13F contre 1,0277 pour les témoins). De plus aucunes excentricités de la moelle n'a été trouvée statistiquement ($p < 0,05$) L'accroissement moyen de diamètre ΔD dans les deux directions a été estimé (figure 18). Dans la direction perpendiculaire aux flexions, malgré une différence de moyenne, on n'observe pas de différence significative de d'accroissement radial entre les arbres 1F et 13F (respectivement $\Delta D = 2,56$ mm et $\Delta D = 3,37$ mm) ($p < 0,05$). Cependant, pour ces deux conditions, ces augmentations de diamètres sont significativement plus importantes que celles des arbres témoins ($\Delta D = 2,05$ mm) ($p < 0,05$).

L'analyse de la croissance secondaire dans la direction des flexions montre une plus forte augmentation de diamètre chez les arbres 13F ($\Delta D = 4,01$ mm) par rapport aux arbres 1F ($\Delta D = 2,87$ mm) et aux arbres témoins ($\Delta D = 2,21$ mm) ($p < 0,05$). De plus les augmentations

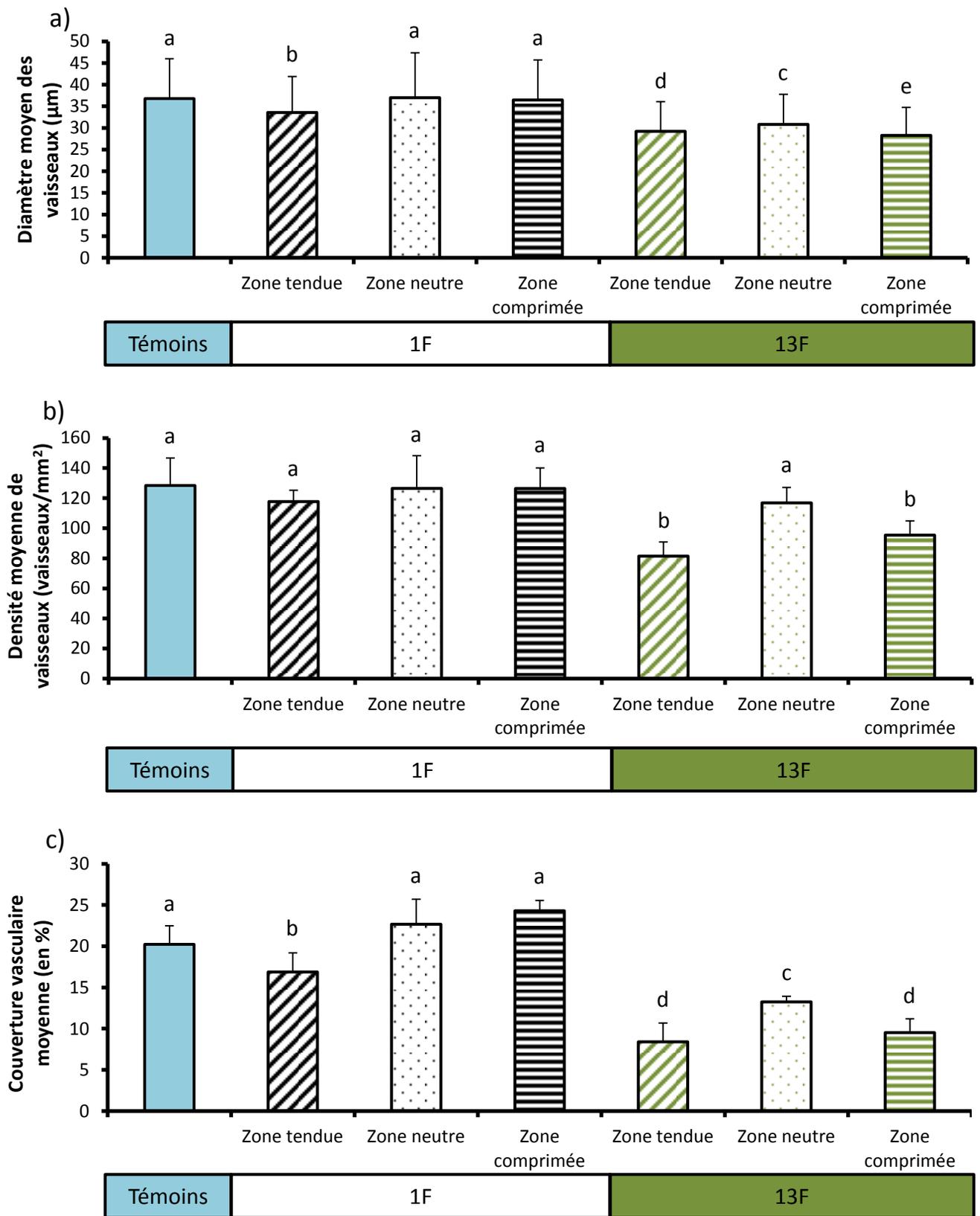


Figure 19: Effet de différents régimes de flexion sur les caractéristiques anatomiques des vaisseaux du bois de tiges de peuplier. Le diamètre moyen des vaisseaux D_v (a), leur densité d_v (b) et la couverture vasculaire C_v (c) ont été mesurés par analyse d'images (microscopie optique, grossissement X10) de coupes cytologiques ($18\mu\text{m}$ d'épaisseur) de tiges de peuplier fléchis ou non. Dans chaque section de tige d'arbre fléchi, trois zones (zone tendue (T), zone neutre (N), zone comprimée (C)) sont analysées. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de 11 arbres témoins, 8 arbres fléchis 1 fois par jour 3 jours successifs par semaine (1F), et 4 arbres fléchis 13 fois par jour (13F) à raison de 7 jours par semaine. Les lettres a, b, c, d et e représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$).

de diamètre dans la direction des flexions sont aussi significativement plus grandes chez les arbres 1F par rapport aux arbres témoins ($p < 0,05$) (figure 18).

III.2. Effets de flexions répétées de la tige sur les caractéristiques anatomiques des vaisseaux du bois

Kern *et al.* (2005) ont montré une diminution de la couverture vasculaire due principalement à une diminution du diamètre des vaisseaux dans le bois de flexion mis en place suite à des flexions bidirectionnelles par rapport à un bois d'arbres témoins. Dans le but d'étudier les effets de flexions répétées unidirectionnelles sur les caractéristiques anatomiques des vaisseaux du bois, des analyses sur coupes cytologiques ont été effectuées.

Les modifications de la structure anatomique du bois de peuplier mis en place sous stress mécanique ont été caractérisées à l'échelle tissulaire : les diamètres (D_v) et densités (d_v) de vaisseaux ont été mesurés à partir d'images de microscopie optique dans les zones tendues (T), comprimées (C) et neutres (N) produites pendant les sollicitations dans les dix-neuf arbres de l'expérimentation n°1 (un lot d'arbres témoins et un lot d'arbres 1F) et les quatre arbres 13F de l'expérimentation n°2. La couverture vasculaire (C_v) a été évaluée sur ces mêmes données.

Chez les arbres 1F seuls les vaisseaux mis en place dans le bois en tension (T) présentent un diamètre moyen ($D_v = 33 \mu\text{m}$) légèrement plus petit que ceux observés dans le bois des arbres témoins ($D_v = 37 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$) (figure 19.a).

Quelque soit la zone considérée au sein de la tige (tendue (T), comprimée (C) ou neutre (N)) chez les arbres 13F, le diamètre moyen des vaisseaux ($D_v = 37 \mu\text{m}$) est significativement plus petit ($p < 0,05$) que dans le bois des arbres témoins. Ces arbres 13F montrent aussi des vaisseaux significativement plus petits que ceux des arbres 1F.

Le bois des arbres 13F présente des diamètres moyen de vaisseaux dans la zone en compression ($D_v = 28,3 \mu\text{m}$) légèrement plus petits que ceux des vaisseaux de la zone en tension ($D_v = 29 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Les vaisseaux présents dans la zone neutre (non sollicitée lors de la flexion) ont un diamètre ($D_v = 31 \mu\text{m}$) plus grand que ceux des vaisseaux des zones tendue et comprimée ($p < 0,05$).

La densité de vaisseaux (figure 19.b) n'est significativement affectée par la stimulation mécanique que dans les zones tendue et comprimée de bois des arbres du traitement 13F. Dans ce cas, la densité de vaisseaux est réduite respectivement de 20,6% et de 23.1% dans les zones tendue et comprimée ($p < 0,05$).

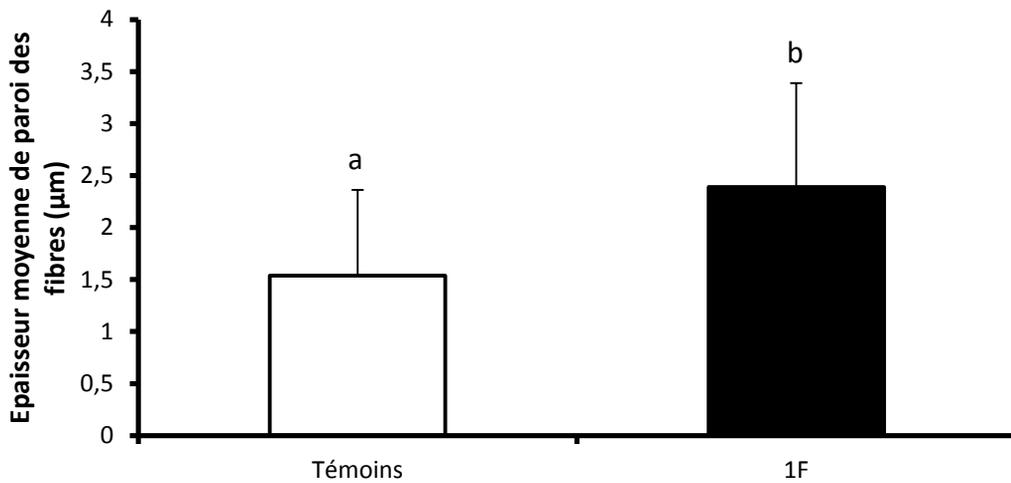


Figure 20: Effet des flexions sur l'épaisseur de la paroi des fibres du bois de peuplier. L'épaisseur des parois a été mesurée sur 200 cellules par analyse d'images (microscopie optique, grossissement X100) de coupes (2µm d'épaisseur) de tiges de peuplier fléchis ou non. Les mesures ont été réalisées uniquement dans la zone de la tige sollicitée en tension (T) lors de la flexion. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de 11 arbres témoins et 8 arbres fléchis 1 fois par jour 3 jours successifs par semaine (1F). Les lettres a et b représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$).

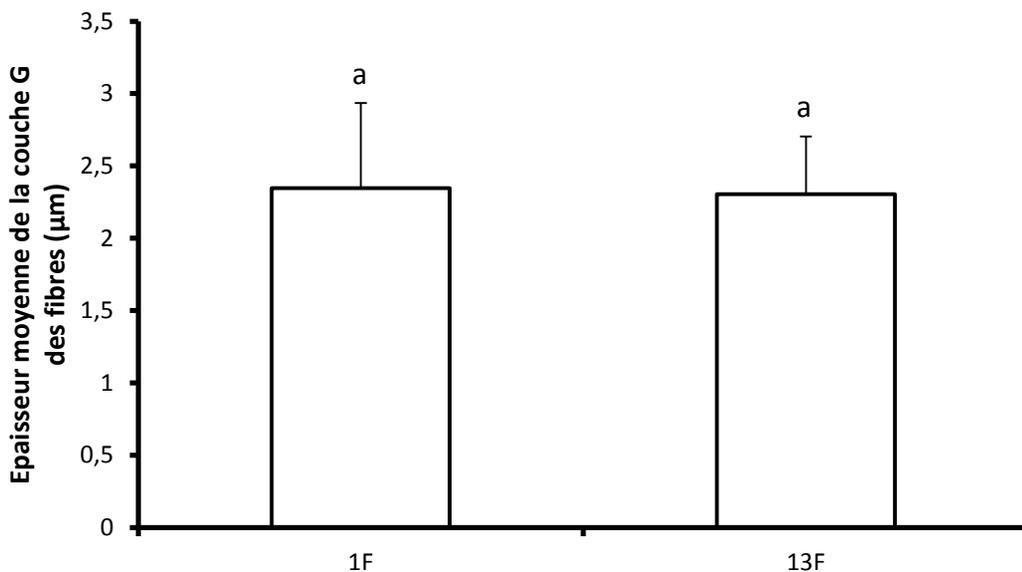


Figure 21: Effet de différents régimes de flexion sur l'épaisseur de la couche G des fibres du bois de tiges de peuplier. L'épaisseur des couches G a été mesurée sur 150 cellules à partir d'images (microscopie optique, grossissement X100) de coupes (2µm d'épaisseur) de tiges de peuplier fléchis 1 fois par jour 3 jours successifs par semaine (1F) et fléchis 13 fois par jour (13F) à raison de 7 jours par semaine. Les mesures ont été réalisées uniquement dans la zone de la tige sollicitée en tension (T) lors de la flexion. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de 4 arbres 1F et 4 arbres 13F. La lettre a représente un groupe statistiquement homogène ($p < 0,05$).

Pour les zones (C) et (N), la couverture vasculaire (surface cumulée des vaisseaux sur la surface totale de xylème) dans le bois des arbres 1F (figure 19.c) n'est pas différente de celle du bois des arbres témoins qui montre une couverture $C_v = 20,2\%$; sauf dans la zone en tension (T) où elle est significativement réduite d'environ 20% ($p < 0,05$). En revanche, dans le bois des arbres 13F, la couverture vasculaire est partout nettement plus petite que dans les zones correspondantes du bois des arbres témoins ainsi que des arbres 1F ($p < 0,05$). Au sein des arbres 13F, la couverture vasculaire du bois formé dans les zones tendue et comprimée (respectivement : $C_v = 8,40\%$ et $C_v = 9,52\%$) est significativement plus faible que celle du bois formé dans la zone neutre ($C_v = 13,25\%$) ($p < 0,05$).

III.3. Effets de flexions répétées sur les caractéristiques pariétales des fibres de bois de peuplier

Dans la littérature (Pilate *et al.*, 2004), il a été montré que des modifications à l'échelle pariétale avaient lieu dans le bois de tension formé suite à un stress gravitropique. Afin de caractériser les parois des fibres de bois de flexion des mesures d'épaisseurs de parois sur coupes cytologiques ont été réalisées.

III.3.a. Impacts des flexions répétées sur l'épaisseur de paroi des fibres

Les mesures d'épaisseur de parois ont été réalisées par analyse d'images sur les fibres du bois formé sous stress mécanique à partir de photos de microscopie optique (grossissement x100) de coupes cytologiques réalisées sur les arbres de l'expérience n°1 (8 arbres 1F et 11 arbres témoins). Sur la figure 20, on observe que les parois des fibres de bois dans la zone tendue des arbres 1F sont nettement plus épaisses ($e = 2,39 \mu\text{m}$) que les parois des fibres de bois témoins ($e = 1,54 \mu\text{m}$), soit une augmentation de plus de 55% ($p < 0,05$).

III.3.b. Effets de flexions répétées sur la formation de couche G dans le bois de flexion

Les épaisseurs de la couche G ont été mesurées sur des cellules de fibres par analyse d'images sur des photos en microscopie optique (grossissement x100) de la zone tendue du bois formé sous stress mécanique. L'échantillonnage concernait les tiges des arbres 1F de l'expérience n°1 ($n = 8$), et des arbres 13F de l'expérience n°2 ($n = 4$). La figure 21 montre qu'il n'y a pas de différence d'épaisseur de couche G entre les deux traitements. Sur l'ensemble des coupes analysées, aucune cellule de fibre présentant de la couche G n'a été trouvée dans la zone comprimée des tiges de peuplier.

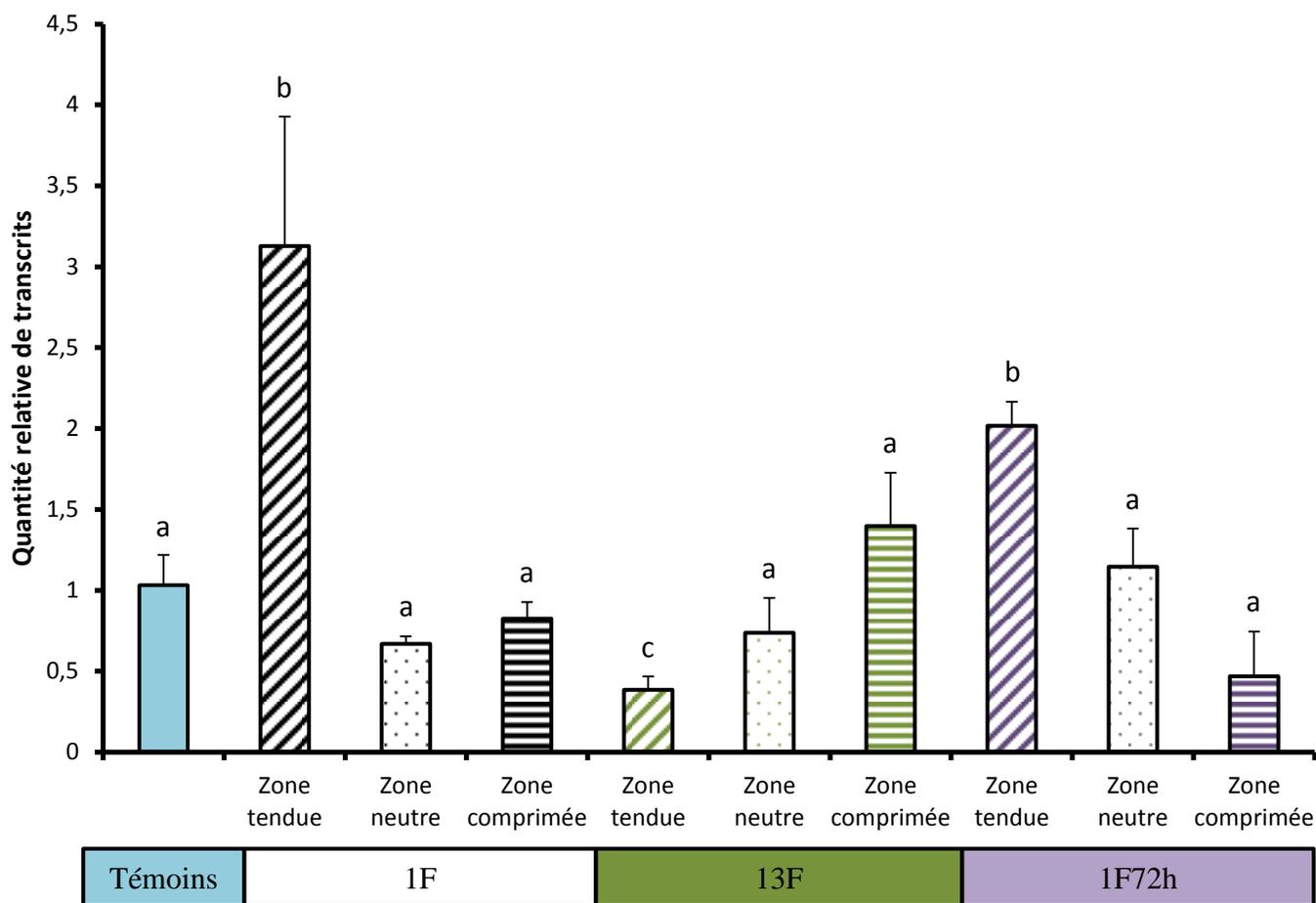


Figure 22: Modifications de l'accumulation relative des transcrits *PtaXLIM1a* en réponse aux flexions. L'expression relative est obtenue par Q-PCR sur des échantillons de zones de bois mis en place durant la seconde expérimentation. La moyenne des quantités relatives de transcrits *PtaXLIM1a* dans le bois d'arbres témoins a été placée à 1 arbitrairement. Dans chaque section de tige d'arbre fléchi, trois zones (zone tendue (T), zone neutre (N), zone comprimée (C)) sont analysées. Les valeurs représentées correspondent à la quantité relative moyenne de transcrits *PtaXLIM1a* de 3 arbres témoins, 3 arbres fléchis 1 fois par jour 3 jours successifs par semaine (1F), 4 arbres fléchis 13 fois par jour à raison de 7 jours par semaine (13F) et respectivement 4, 2 et 3 arbres fléchis 1 fois 72h avant prélèvement (1F72h) pour les zones tendue, neutre et comprimée. Pour cette analyse Q-PCR le gène de référence *EF1-alpha* a été utilisé et le nombre de répétitions techniques est de deux. Les lettres a, b et c représentent des groupes statistiquement homogènes ($p < 0,05$).

III.4. Réponses moléculaires dans la zone en croissance secondaire de tige de peuplier après différents régimes de flexions

Dans le but d'identifier des mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place du bois de flexion, une approche gène-candidat a été adoptée. Dans la littérature (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006) il a été montré que le gène *PtaXLIM1a* est surexprimé dans le bois de tension (un bois présentant des caractéristiques anatomiques proches de celles du bois de flexion). Les modifications de l'accumulation des transcrits *PtaXLIM1a* en réponse à différents régimes de flexion ont été évalués par Q-PCR.

L'accumulation relative de transcrits *PtaXLIM1a* a été mesurée sur la portion de tige fléchie d'arbres témoins (3 arbres), 1F (3arbres), 13F (4 arbres) et 1F72h (respectivement 4, 2 et 3 arbres pour les zones tendues, neutres et comprimées) de l'expérimentation n°2 (figure 22). L'expression relative moyenne de *PtaXLIM1a* dans les arbres témoins, où les déformations sont nulles, a été utilisée comme zone de référence et normalisée à 1. Sur la totalité des zones analysées, seulement 3 présentent une accumulation relative de transcrits *PtaXLIM1a* statistiquement ($p < 0,05$) différente de celle des arbres témoins. Les zones tendues des arbres 1F et 1F72h présentent une expression relative plus importante (respectivement 3,12 et 2,01 fois plus exprimé chez les arbres 1F et 1F72h) que les arbres témoins. La zone tendue des arbres 13F montre elle aussi une différence significative ($p < 0,05$) d'expression de *PtaXLIM1a* par rapport aux arbres témoins, mais dans ce cas c'est une sous-expression du gène qui est observée (0,38 fois moins exprimé chez les arbres 13F).

IV. Discussion, conclusion générale et perspectives

Une des réponses thigmomorphogénétique importante se caractérise chez certaines espèces par une diminution de croissance en hauteur comme ont pu le montrer Coutand *et al.* (2000) sur la tomate (*Lycopersicon esculentum*), Moulia et Combes (2004) sur la luzerne (*Medicago sativa*), Braam (2005) sur *Arabidopsis thaliana*, Telewski et Pruyne (1998) sur l'Orme d'Amérique (*Ulmus americana*) et Kern *et al.* (2005) sur le peuplier (*Populus trichocarpa* x *deltoides*). Cependant, Kern *et al.* (2005) avait aussi montré une grande variabilité de cette réponse, même à l'échelle intra-spécifique. Jusqu'à présent, toutes les études menées au laboratoire semblaient montrer une absence de réponse de la croissance

primaire du clone 717-1B4 de *Populus tremula x alba* aux flexions. Nous avons montré pour la première fois une diminution de la croissance primaire de peupliers (*Populus tremula x alba*, clone 717-1B4) lorsque celui-ci était fléchi plusieurs fois par jour, tous les jours (traitement 13F). Cependant, dans le cadre d'un régime de flexions moins fréquentes (traitement 1F), nous n'avons pas pu détecter de réponse de croissance primaire. Il semblerait donc que la croissance primaire du clone 717-1B4 ne soit pas, comme envisagé jusqu'à présent, totalement insensible aux flexions. Ces résultats posent en revanche la question de l'existence possible d'un seuil à partir duquel les arbres présenteraient une réponse thigmomorphogénétique en croissance primaire et de la nature de ce seuil. Il pourrait être en effet dû au rythme journalier de sollicitations (nombre de flexions par jour) ou dû aux nombres de jours de sollicitations par semaine. Une étude prenant en compte plusieurs régimes de flexion pourraient permettre de valider l'hypothèse de la notion de seuil dans la réponse thigmomorphogénétique en croissance primaire de *Populus tremula x alba* (clone 717-1B4).

La réponse thigmomorphogénétique se caractérise également chez de nombreuses espèces par une augmentation de la croissance en diamètre des tiges. En 1998, Telewski et Pruyn avaient montré une augmentation de croissance radiale chez *Ulmus americana* suite à des flexions répétées de la tige. Bien que leur étude ait testé plusieurs régimes de flexions (de 5 à 80 flexions par jour), les auteurs n'ont pas observé de différence significative de croissance radiale entre les différents régimes de flexion appliqués. Nous avons aussi observé des augmentations significatives ($p < 0,05$) de croissance radiale des arbres mécaniquement stimulés. Mais contrairement à Telewski et Pruyn (1998), nous avons aussi observé un effet dose pour les arbres stimulés plus fréquemment (traitement 13F). Des expérimentations complémentaires dédiées à la compréhension de l'effet de différents régimes de flexions pourraient permettre de mettre en évidence la ou les composantes du régime de flexion influençant cet effet dose. Les résultats de Telewski et Pruyn (1998), nous permettent aussi de suggérer l'existence d'une variabilité inter-spécifique importante de cet effet dose..

Chez *Populus tremula x alba*, Martin *et al.* (2010) ont montré un phénomène d'accommodation à des flexions unidirectionnelles de la tige après trois jours consécutifs de traitement ; et ce quelque soit le nombre de flexions. Lors de nos expérimentations, nous n'avons pas observé d'effets d'acclimatation de ce type. Si un tel effet avait été présent, les augmentations de diamètres du traitement 1F seraient les mêmes que celles mesurées sur les arbres du traitement 13F. Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par le fait que les déformations maximales appliquées sur nos arbres (environ 1,5%) étaient d'amplitude plus modérée que celles qui avaient été appliquées lors des expérimentations reportées par

Martin *et al.* (2010), qui étaient, elles, dans une gamme de 3 à 6%. On peut donc suggérer l'existence d'un effet cumulatif de l'amplitude et de la fréquence des stimulations. Les déformations plus importantes dans le cas de Martin *et al.* (2010) auraient alors entraîné une désensibilisation plus rapide.

Nous avons montré qu'une flexion unidirectionnelle générait une ovalisation significative de la tige des arbres fréquemment sollicités (13F) ; avec la même tendance, toutefois non statistiquement significative, pour le traitement 1F. Kern *et al.* (2005) avaient également montré une ovalisation des tiges de *Populus trichocarpa x deltoides* suite à des flexions répétées. L'allocation de biomasse dans l'augmentation du diamètre dans la direction de la flexion pourrait être une forme d'acclimatation au vent à moindre coût énergétique pour les arbres en condition naturelle. En effet, une augmentation de diamètre, même dans une seule direction, a pour conséquence d'augmenter la rigidité de la tige. La rigidité d'une tige est proportionnelle au « second moment d'inertie de la section » noté I ; avec $I = (\pi r_1 \times r_2^3)/4$ où r_1 et r_2 sont les rayons principaux de l'ellipse. La rigidité de la tige dans la direction de sollicitation mécanique varie donc à la puissance 3 du rayon augmenté. Ceci a pour effet, pour une force donnée, de considérablement diminuer les déformations des tissus de la tige et donc de préserver la structure de la rupture.

Nous avons observé une augmentation significative du diamètre dans la direction de la ligne neutre chez les arbres 1F et 13F. La ligne neutre ne subissant théoriquement pas de déformation, l'augmentation de diamètre des arbres fléchis aurait dû être la même que celle des arbres témoins. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : (i) la culture en hydroponie (jamais réalisée dans des études sur le bois de flexion dans la littérature) jouerait un rôle dans cette réponse inattendue par une dynamique de croissance anormalement accrue par rapport à des arbres en pleine terre, (ii) les flexions pourraient induire deux types de réponses. Il pourrait ainsi y avoir une réponse globale d'allocation de biomasse accrue dans l'intégralité de la tige à laquelle s'ajouterait une réponse locale spécifique liée à l'intensité de la stimulation des tissus. Ces hypothèses ne sont pas exhaustives et des expériences complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question.

Nos résultats anatomiques sur le bois de flexion ont montré que, à l'échelle tissulaire, seul le bois des arbres ayant subi le traitement 13F semble présenter une réponse en termes de densité de vaisseaux et de diamètre de vaisseaux. Les vaisseaux des arbres 13F sont plus petits et ont une plus faible densité que les vaisseaux des arbres témoins. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kern *et al.* (2005). Des études menées sur les propriétés hydrauliques du bois ont montré que la diminution du diamètre des vaisseaux engendre une

baisse de la conductance hydraulique. En effet, la conductance hydraulique d'un conduit cylindrique varie comme la puissance 4 de son diamètre (Zimmermann 1983). Les vaisseaux de la zone tendue des arbres 13F ont un diamètre environ 20% plus petit que celui des témoins mais la conséquence fonctionnelle hydraulique est que la conductance des vaisseaux est diminuée de plus de 60%. A cet effet, doit s'ajouter le fait que le nombre de vaisseaux (dv) diminue dans les arbres 13F. On peut donc suggérer la présence d'un trade-off qui permettrait à l'arbre d'améliorer la rigidité de sa tige mais au détriment de sa capacité à alimenter ses différents organes en eau. L'absence de modification de ces deux paramètres anatomiques dans le bois d'arbre 1F pourrait être expliquée par la présence d'un effet seuil.

Kern *et al.* (2005) ont observé une diminution de la couverture vasculaire dans le bois d'arbres fléchis. Dans le cadre de notre étude, nous avons également observé une nette réduction de la couverture vasculaire chez les arbres du traitement 13F. Ce résultat suggère indirectement une augmentation de la densité du bois, laquelle est fortement affectée par les tailles et nombres de vaisseaux. Ce résultat est cohérent avec des travaux cités par Felten et Sundberg (2013) qui indiquaient une augmentation de la proportion de fibres dans le bois de tension laquelle impacte directement la couverture vasculaire des vaisseaux. Des résultats similaires ont été montrés sur le bois de tension par Jourez *et al.* (2001) et par Ruelle *et al.* (2006) qui ont observé une diminution du nombre de vaisseaux par rapport à du bois dit "normal".

La paroi des cellules végétales est une entité dynamique qui gouverne la croissance et le développement des plantes. La modulation de l'épaisseur et de la qualité de la paroi des cellules est considérée comme une manière de s'adapter à des stress mécaniques qui pourraient se révéler préjudiciables à la plante. Aucune étude antérieure n'a abordé la structure du bois de flexion à l'échelle pariétale. Nos résultats à l'échelle pariétale montrent, dans la zone sollicitée en tension, une augmentation importante de l'épaisseur de la paroi secondaire dans les cellules de fibre de bois des arbres stimulés par rapport aux arbres témoins ; et ce dès le traitement modéré 1F. Ce résultat suggère une augmentation de la densité de bois dans les tiges d'arbres fléchis, laquelle a été également reportée par Kern *et al.* (2005). Il serait intéressant de tester un effet dose sur cet épaissement pariétal des fibres de bois d'arbres en analysant les arbres du traitement 13F. De même, il serait intéressant d'effectuer une comparaison entre les épaisseurs de parois des fibres présentes dans la partie en compression et celles présentes dans la partie en tension dans le but de tester si l'allocation de biomasse dans les fibres est un processus global sur l'ensemble de la section ou localement dépendant de l'amplitude de la sollicitation mécanique subie par le tissu.

Les mesures effectuées sur l'épaisseur des couches G présentes dans la zone tendue des arbres 1F et 13F n'ont pas révélé d'effet différentiel des différents régimes de flexion. Les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues dans le cadre d'études sur la mise en place du bois de tension impliquant un stress gravitropique permanent (Chang *et al.*, 2014, chez *Populus tremula x alba* ; Yoshinaga *et al.*, 2012, chez *Populus deltoides x P. nigra*). On peut donc faire l'hypothèse que les mécanismes liés à la production de couches G sont contraints par une limite au-delà de laquelle l'épaisseur ne peut être augmentée (entre 2,5 et 3,5 μm chez le peuplier) ; épaisseur que les couches G de nos arbres stimulés aurait atteinte dès le traitement modéré (1F). Enfin l'absence totale de couche G dans les fibres de la zone sollicitée en compression, alors qu'on en retrouve fréquemment en faible quantité dans des arbres non stimulés mécaniquement (Telewski, 2006), montre que la formation de la couche G est un processus dépendant du signe du stimulus et non seulement de son amplitude. Ce résultat suggère de plus un processus d'inhibition totale de la production de couche G dans la zone en compression.

Les mécanismes moléculaires contrôlant la mise en place des bois de réaction sont encore mal connus. Leur connaissance pourrait pourtant s'avérer très utile pour des analyses de sensibilité ou pour l'identification des facteurs physiques perçus dans le cas d'un stress mécanique (Coutand *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2010), et donc pour mieux comprendre la différenciation du bois et la thigmomorphogénèse. Dans notre étude, l'accumulation relative des transcrits PtaXLIM1a, mesurée par Q-PCR, présente une forte augmentation dans la zone tendue des arbres 1F et 1F72h. Ceci est en accord avec les données d'expression de ce gène obtenues dans le bois de tension et décrites dans la littérature (Arnaud *et al.*, 2012 ; Andersson-Gunneras *et al.*, 2006). A l'inverse, ce gène semble sous-exprimé dans la zone tendue des arbres 13F, ce qui n'avait jamais été montré jusqu'à présent. Les résultats d'expression que nous avons obtenus en fonction des différents régimes ne peuvent d'aucune manière être corrélés avec nos résultats anatomiques. PtaXLIM1a pourrait donc être responsable de la mise en place dans le bois de flexion de modifications biochimiques ou structurelles que nous n'avons pas abordées dans notre étude. D'après la littérature, PtaXLIM1a serait impliqué dans le contrôle de la lignification et de la stabilité des filaments d'actine du cytosquelette (Kawaoka *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2006 ; Papuga *et al.*, 2010). Il est également soupçonné d'être un acteur important de la croissance anisotrope de certaines cellules telles que les fibres du xylème (Arnaud *et al.*, 2012). Il semblerait donc intéressant, de réaliser des analyses complémentaires sur la longueur des fibres et sur la quantité de lignine du bois de flexion afin de mieux comprendre le rôle de ce gène.

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'augmentation de la proportion de fibres et à l'augmentation de l'épaisseur de la paroi de ces cellules dans le bois de flexion, nous souhaiterions poursuivre notre étude par des analyses de l'expression des gènes SND1 et NST1 connus pour leur fonction de pivot dans le réseau de gènes contrôlant la différenciation des fibres (Zhong *et al.* 2010).

Dans les travaux antérieurs visant à caractériser le xylème, le bois de flexion était formé par sollicitations successives en tension et en compression. Ce travail est le premier à mener des investigations sur le bois de flexion en distinguant clairement le bois sollicité en tension de celui sollicité en compression. Ce travail était aussi la première fois où la caractérisation était menée à l'échelle pariétale. Nos résultats suggèrent une augmentation de la densité du bois de flexion dans la zone tendue (par le biais conjoint, de vaisseaux moins nombreux, plus petits, d'épaisseur de paroi de fibre plus importante et la présence de couche G), une diminution de la densité et du nombre de vaisseaux par rapport au bois d'arbres témoin. La présence de couche G dans les cellules de fibres de bois de flexion dans la zone tendue uniquement a également été observée. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature sur les caractéristiques du bois de flexions (Kern *et al.*, 2005) mais montrent aussi beaucoup de similitudes avec le bois de tension mis en place suite à un stress gravitropique (Pilate *et al.*, 2004 ; Felten et Sundberg, 2013). Cela suggère que les mécanismes qui régissent leur mise en place pourraient être identiques. Néanmoins, de nombreux autres paramètres sont modifiés dans le bois de tension, comme la longueur des fibres et des éléments de vaisseaux, l'angle des microfibrilles, la composition chimique des fibres de bois. Afin de trancher sur la similitude ou différence entre le bois de tension et le bois de flexion en zone tendue, il reste donc encore à mesurer ces caractéristiques dans le bois de flexion. Par contre, nous pouvons déjà établir clairement que le bois de flexion dans la zone comprimée ne correspond pas aux critères du bois de tension, entre autre en raison de l'absence totale de couche G. Enfin, au sein d'un arbre fléchi, les caractéristiques des fibres (épaisseur de paroi, composition pariétale, longueur) n'ont jamais été mesurées dans la zone en compression. Des investigations complémentaires sur la structure des fibres dans les différentes zones de bois de flexion seraient donc intéressantes pour pouvoir mieux évaluer le degré de ressemblance entre le bois de tension et le bois de flexion.

Il reste donc des perspectives d'investigations à mener pour mieux comprendre les déterminants physiques qui pilotent la formation du bois de flexion, ainsi que les mécanismes moléculaires en jeu et les implications fonctionnelles pour le bois dans l'arbre soumis au vent.

Almeras, T., E. Costes and J.C. Salles 2004. Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. *Ann Bot* 93(4):455-68

Andersson-Gunneras, S., E.J. Mellerowicz, J. Love, B. Segerman, Y. Ohmiya, P.M. Coutinho, P. Nilsson, B. Henrissat, T. Moritz and B. Sundberg 2006. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant J* 45(2):144-65.

Arnaud, D., A. Déjardin, J.C. Leplé, M.C. Lesage-Descauses, N. Boizot, M. Villar, H. Bénédicti and G. Pilate 2012. *BMC Res Notes* 5:102. doi: 10.1186/1756-0500-5-102.

Botella, M.A., Y. Xu, T.N. Prabha, Y. Zhao, M.I. Narasimhan, K.A. Wilson, S.S. Nielsen, R.A. Bressan and P.M. Hasegawa 1995. *Plant Physiol.* 112(3):1201-10.

Braam, J. (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*. 165: 373-389.

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

Chang, S., L. Salmen, A.M. Olsson and B. Clair 2014. Deposition and organisation of cell wall polymers during maturation of poplar tension wood by FTIR microspectroscopy, *PLANTA* 239:1: 243-254.

Coutand, C., J.L. Julien, B. Moulia, J.C. Mauget and D. Guitard 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *J Exp Bot* 51(352):1813-24.

Coutand, C. and B. Moulia 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *J Exp Bot* 51(352):1825-42.

Coutand, C., L. Martin, N. Leblanc-Fournier, M. Decourteix, J.L. Julien and B. Moulia 2009. Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and *PtaZFP2* gene expression in Poplar. *Plant physiology*. 151: 223-232.

Déjardin, A., J.C. Leplé, M.C. Lesage-Descauses, G. Costa and G. Pilate 2004. *Plant Biol* 6(1):55-64.

Déjardin, A., F. Laurans, D. Arnaud, C. Breton, G. Pilate and J.C. Leplé 2010. *CR Biol.* 333(4):325-34. doi: 10.1016

Du, S. and F. Yamamoto 2007. An Overview of the Biology of Reaction Wood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (2): 131–143

Erner Y. and M. Jaffe 1983. Thigmomorphogenesis: membrane lipid and protein changes in bean plants as affected by mechanical perturbation and Ethrel. *Physiologia plantarum* 58: 197-203.

Felten, J. and B. Sundberg 2013. Biology, chemistry and structure of tension wood. In: Fromm J(ed) Cellular aspects of wood formation, plant cell monographs 20. Springer, Heidelberg, pp203–224

Jin, H., J. Do, D. Moon, E.W. Noh, W. Kim and M. Kwon 2011. EST analysis of functional genes associated with cell wall biosynthesis and modification in the secondary xylem of the yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) stem during early stage of tension wood formation. *Planta* 234:959–977.

Jourez, B., A. Riboux and A. Leclercq 2001. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv ‘Ghoy’). *IAWA Journal* 22: 133-157

Kawaoka, A., P. Kaothien, K. Yoshida, S. Endo, K. Yamada and H. Ebinuma 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J.* 22(4):289-301.

Kern K., B. Ewers, F.W. Telewski and L. Koehler 2005. Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology.* 25:1243-1251.

Knight M.R, S.M. Smith and A.J. Trewavas 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Plant Biology* Vol. 89, pp. 4967-4971.

Lafarguette F., J.C. Leplé, A. Déjardin, F. Laurans, G. Costa, M.C. Lesage-Descause and G. Pilate 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* 164: 107–121.

Love J., S. Björklund, J. Vahala, M. Hertzberg, J. Kangasjärvi and B. Sundberg 2009. Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *PNAS*.106: 5984–5989.

MacMillan, C.P., S.D. Mansfield, Z.H. Stachurski, R. Evans and S.G. Southerton 2010. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal* 62,689-703.

Martin L., N. Leblanc-Fournier, W. Azri, C. Lenne, C. Henry, C. Coutand and J.L Julien 2009. Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein. *Tree Physiol.* 29(1):125-36.

Martin L., N. Leblanc-Fournier, J.L. Julien, B. Moulia and C. Coutand 2010. Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *J Exp Bot.* 61:2403-2412.

Matsuzaki J., M. Masumori and T. Tange 2007. Phototropic bending of non-elongating and radially growing woody stems results from asymmetrical xylem formation. *Plant Cell Environ.* 30(5):646-53.

Monshausen G.B. and S. Gilroy 2009. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol.* 19(5):228-35.

Monshausen G.B. and E.S. Haswell 2013. A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *J Exp Bot.* 64(15):4663-80

Moulija B. and C. Combes 2004. Thigmomorphogenetic acclimation of plants to moderate winds greatly affects height structure in field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.), an indeterminate herb. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137: 77.

Moyle R., J.Schrader, A. Stenberg, O. Olsson, S. Saxena, G. Sandberg and R.P. Bhalerao 2002. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid aspen. *The Plant Journal* 31(6), 675-685

Murashige, T. and F. Skoog 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.

Papuga J., C.Hoffmann, M. Dieterle, D. Moes, F. Moreau, S. Tholl A. Steinmetz and C. Thomas 2010. Arabidopsis LIM Proteins: A Family of Actin Bundlers with Distinct Expression Patterns and Modes of Regulation. *The Plant Cell*, Vol. 22: 3034–3052

Paux E., V. Carocha, C. Marques, A.M. de Sousa, N. Borralho, P. Sivarion and J Grima-Pettenati 2005. Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation. *New Phytologist* 167 : 89–100.

Pilate G., B. Chabbert, B. Cathala, A. Yoshinaga, J. Leplé, F. Laurans, C. Lapierre and K. Ruel 2004. Lignification and tension wood. *C. R. Biologies.* 327: 889-901.

Pitre F.E., F. Lafarguette, B. Boyle, N. Pavy, S. Caron, N. Dallaire, P.L Poulin, M. Ouellet, M.J. Morency, N. Wiebe , E. Ly Lim, A. Urbain , G. Mouille, J.E. Cooke and J.J. Mackay 2010. High nitrogen fertilization and stem leaning have overlapping effects on wood formation in poplar but invoke largely distinct molecular pathways. *Tree Physiol.* 30(10):1273-89.

Pruyn M., B. Ewers and F.W. Telewski 2000. Thigmomorphogenesis: change in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiology.* 20: 535-540.

Ruelle, J., B. Clair, J. Beauchene, M.F. Prévost and M. Fournier 2006. Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species. 2. Comparison of some anatomical and ultrastructural criteria. *IAWA Journal* 27: 341-376

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

Telewski F.W. 1989. Structure and function of flexure wood in *Abies fraseri*. *Tree Physiology* 5, 113-121.

Telewski F.W. and M. Pruyn 1998. Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* 18: 65-68.

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

Thomas C., C. Hoffmann, M. Dieterle, M. Van Troys, C. Ampe and A. Steinmetza 2006. Tobacco WLIM1 Is a Novel F-Actin Binding Protein Involved in Actin Cytoskeleton Remodeling. *The Plant Cell*, Vol. 18, 2194–2206.

Wang F., X. Cui, Y. Sun and C.H. Dong 2013. Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Rep* 32:1099–1109.

Yamashita S., M. Yoshida and H. Yamamoto 2009. Relationship between development of compression wood and gene expression. *Plant Science* 176 729–735.

Yoshinaga A., H. Kusumoto, F. Laurans, G. Pilate and K. Takabe 2012. Lignification in poplar tension wood lignified cell wall layers. *Tree Physiol* 32(9):1129-36.

Zhong R., C. Lee and Z.-H. Ye 2010. Functional Characterization of Poplar Wood-Associated NAC Domain Transcription Factors. *Plant Physiology* 152: 1044-1055.

Zimmermann, M. H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo 143 pp. 64 Figs.