

Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier (Populus tremula x Populus alba)

Wassim Azri

▶ **To cite this version:**

Wassim Azri. Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier (Populus tremula x Populus alba). Génétique des plantes. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université Tunis El Manar (Tunisie), 2009. Français. NNT : 2009CLF21915 . tel-00725935

HAL Id: tel-00725935

https://theses.hal.science/tel-00725935

Submitted on 28 Aug 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL — UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D.U. 1915 — ANNEE 2009

ECOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre 497

THÈSE

En cotutelle avec l'UNIVERSITE TUNIS EL MANAR (TUNISIE)

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(**SPECIALITE** : Physiologie et Génétique Végétales)

Soutenue le 06 mars 2009

Par **Wassim AZRI**

Mécanismes moléculaires de la graviperception chez le peuplier (*Populus tremula x Populus alba*)

Président :

Jean-Louis JULIEN	Professeur, Université Blaise Pascal

Membres :

Sadok BOUZID	Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Patricia ROECKEL-DREVET	Professeur, Université Blaise Pascal
Saïda AMMAR	Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Rapporteurs :

Gilles PILATE	Directeur de recherches, INRA Orléans
Mokhtar LACHAAL	Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Laboratoire d'accueil : Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruiter et Forestier

Université Blaise Pascal

FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS

A mes parents

A ma famille

Remerciements

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université Tunis El Manar et l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. Son accomplissement n'aurait été possible sans l'aide de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme le Professeur Patricia DREVET pour l'aide qu'elle m'a apportée pendant ces années de thèse. Ce travail lui doit beaucoup. Patricia a su me conseiller efficacement tout en me laissant travailler très librement. Merci beaucoup pour ta confiance et ton excellente direction.

Je tiens à remercier aussi Mme le Professeur Saïda AMMAR, je lui dois de m'avoir encadré mon travail depuis le DEA et pendant ces années de thèse. Son soutien et sa direction se sont avérés déterminants pour mener ce travail à terme.

Je remercie tous particulièrement Monsieur Gilles PILATE, Directeur de Recherches de l'équipe Formation des Parois des Cellules Lignifiées de l'INRA d'Orléans, et Monsieur Mokhtar LACHAAL, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean-Louis JULIEN, Professeur à l'Université Blaise Pascal, et Directeur de l'UMR INRA-PIAF de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions et d'en être président du jury malgré ses nombreuses obligations.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur Sadok BOUZID, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, et Directeur de l'Unité de Recherches de Morphogenèse et Biotechnologies Végétales, en acceptant de participer au jury de cette thèse en dépit de ses charges multiples.

Je tiens à remercier Christophe CHAMBON de l'INRA de Theix (Clermont-Ferrand) pour son aide experte dans la spectrométrie de masse et Jean-Charles LEPLE et Marie-Claude DESCAUSES de l'INRA d'Orléans pour la technique des puces à ADN.

Je remercie Nicole BRUNEL pour son travail en microscopie, sa gentillesse et son dévouement dans les taches collectives.

Je tiens à remercier Stéphane HERBETTE pour sa gentillesse et son efficacité lors des difficultés au niveau des manips que j'ai rencontrées.

J'adresse mes sincères remerciements à Ichrak BEN REJEB pour son aide et son soutien lors de mon DEA et tout au long de cette thèse.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du PIAF de Clermont-Ferrand et plus particulièrement Soulaïman SAKR, Bruno MOULIA, Catherine COUTAND,

Catherine LENNE, Nathalie LEBLANC, Agnès GUILLOT et Jean-Stéphane VENISSE pour m'avoir accueilli avec toujours beaucoup de gentillesse lors de mes séjours à Clermont ainsi que l'aide et les précieux conseils qu'ils m'ont apportés.

Je remercie beaucoup Sylvaine LABERNIA, Marie-T GERLES, Ginette FAURE, Christelle BOISSELET et Norbert FRIZOT qui m'ont permis de faire mon travail de recherche dans de bonnes conditions.

Merci à tous les thésards et post-doc que j'ai rencontré pendant ces années pour leur joie et les moments de détente. Merci à Jing, Ludovic, Anaïs, Delphine et Malia pour tous les moments rigolos. Merci à mes amis Kahoula, Imen, Senda, Dalila et Hosam pour tous ces grands moments passés ensemble et pour nos week-ends de « décompression ». Merci à mes amis de la Faculté des Sciences de Tunis, Mohamed, Jemâa, Issam, Hakim, Zouhair, Naceur, Khaled, Karim, Nizar et Touhami pour leurs encouragements.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement mes parents. Sans eux, je n'y serais pas arrivé.

Ce travail a été soutenu par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie, Tunisie et l'Agence National de la Recherche, France.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique 4
Chapitre I : Le gravitropisme 4
A. Gravitropisme 5
A.1 Perception de la gravité 5
A.1.1 Polarité des statocytes et rôle du cytosquelette 5
A.1.2 Rôle du protoplaste 9
A.1.3 Rôle de la vacuole dans les tiges 9
A.2 Transduction du signal 10
A.2.1 Les messagers secondaires 10
A.2.2 Rôle du gène ARG1 12
A.3 La réponse gravitropique : La courbure des organes 12
A.3.1 Modulation des réponses gravitropiques induites par l'auxine 12
A.3.2 Réponse des organes à croissance secondaire 15
Chapitre II : Le peuplier : Plante ligneuse modèle 16
A. Le peuplier plante ligneuse modèle 17
A.1 Séquençage du génome de peuplier 17
A.2 Analyse de l'expression du génome 19
A.2.1 Etude du transcriptome 19
A.2.1.1 Principaux types de puces à ADN et application chez les végétaux 21
A.2.1.2 Le transcriptome de peuplier 22
A.2.1.3 Limitations des puces à ADN et nouvelles orientations 23
A.2.2 Etude du protéome 24
A.2.2.1 Principales étapes de l'analyse protéomique 25
Electrophorèse bidimensionnelle 25
Révélation des protéines 26
Analyse informatisée des gels 2D 26
Identification des protéines présentes dans les gels 2D: analyse de spectrométrie de masse *28*
A.2.2.2 Nouvelles approches méthodologiques et technologiques 29
A.2.2.3 Analyse protéomique chez les plantes 32

PARTIE 2 : Matériel et méthodes 34
A. Matériel végétal 35
B. Application du stimulus gravitropique 35
C. Observation anatomique 36
C.1 Préparation des échantillons 36
C.1.1 Fixation, inclusion du matériel végétal dans la résine, et coupes 36
C.1.2 Coloration safranine bleu-astra 36
C.1.3 Coloration PAS 37
C.1.4 Coloration au bleu de toluidine 37
D. Puces à ADN 38

D.1 Extraction des ARN totaux 38
D.2 Le plan d'expérience 38
D.3 Dépôt des sondes 40
D.4 Amplification d'ARN pour hybridation sur microarray 41
D.5 Marquage des cibles 41
D.6 Hybridation sur lame de microarray, lavage et acquisition de l'image 42
D.6.1 Hybridation sur lame de microarray et lavages 42
D.6.2 Aquisition de l'image et des données 42
D.7 La normalisation "de Lowess" 45
D.8 Analyse des lames 45
E. Analyses par électrophorèse bidimensionelle 46
E.1 Préparation des échantillons 46
E.1.1 Solubilisation des protéines 46
E.1.2 Dosage des protéines 46
E.2 Gels d'électrophorèse 2D 47
E.2.1 Focalisation isoélectrique 47
E.2.1.1 Réhydratation 47
E.2.1.2 Migration 47
E.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes 48
E.2.2.1 Réduction/alkylation des molécules 48
E.2.2.2 Migration 49
E.2.3 Coloration des protéines 49
E.2.3.1 Coloration au nitrate d'argent 49
E.2.3.2 Coloration au bleu de Coomassie 49
E.2.4 Analyse qualitative et quantitative informatisée des gels 50
E.2.4.1 Détection automatique des spots et nettoyage des images 50
E.2.4.2 Appariement des spots (ou "matching") 51
E.2.4.3 Normalisation des gels et analyse des données 51
E.2.5 Identification des protéines par spectrométrie de masse 52
E.2.5.1 Digestion des protéines et extraction des peptides générés 52
E.2.5.2 Analyse des échantillons par spectrométrie de masse MALDI-TOF 52
E.2.5.3 Analyse des échantillons par spectrométrie de masse LC-MS/MS 53
E.2.5.4 Identification des protéines par recherche dans les banques de données 54
F. Etude de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative 54
F.1 Plan de l'expérience 55
F.2 La RT-PCR quantitative en temps réel 55
F.2.2 Transcription inverse 56
F.2.3 PCR quantitative en temps réel 56
G. Western blots 57
G.1 Migration et transfert 57
G.2 Immunodétection 57
H. Immunolocalisation *in situ* 58

H.1 Saturation des sites non spécifiques 58
H.2 Réaction avec l'anticorps primaire 58
H.3 Saturation des sites non spécifiques 58
H.4 Dépôt de l'anticorps secondaire 59
H.5 Réaction de coloration 59

PARTIE 3 : Résultats 60
Chapitre I : Coupes anatomiques 60
A. Coupes anatomiques 61
A.1 Formation du bois de tension 61
A.2 Mise en évidence des grains d'amidon 61
Chapitre II: Approche transcriptomique 64
A. Approche transcriptomique 65
A.1 Importance des répétitions des mesures 65
A.2 Identification des gènes dont l'expression est affectée par la gravité 65
Chapitre III: Approche protéomique 70
Article: Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation 71
Chapitre IV: Principaux résultats acquis par RT-PCR quantitative, western blot et immunolocalisation *in situ*, ... 102
A. Suivi de l'expression des gènes codant pour des protéines régulées par l'inclinaison 103
Quantification de l'expression de gènes en cinétique par RT-PCR Quantitative 103
B. Analyse protéique par western blot et immunolocalisation *in situ* de la thioredoxine Thx h1 et Thx h2 104
B.1 Régulation de la thiorédoxine 106
B.1.1 Analyse par western blot 106
B.1.2 Immunolocalisation *in situ* de Thx h1 et Thx h2 106
Chapitre V : Discussion 109
A. Caractérisation du stimulus gravitropique et du processus de redressement de la tige 109
B. Observation anatomique 110
B.1 Formation de bois de tension 110
B.2 Localisation des amyloplastes 110
B.3 Etude de la protéine thioredoxine h 111
C. Identification des gènes dont l'expression est régulée par un stimulus gravitropique 113
C.1 Expression des gènes et des protéines 113
C.2 Cytosquelette 117
C.3 Paroi cellulaire 118
C.4 Métabolisme des carbohydrates 119
C.5 Biosynthèse de la lignine 120
C.6 Autres métabolismes 120
C.7 Réponse au stress, croissance et transport 121
C.8 Protéines inconnues et hypothétiques 123
D. Comparaison transcriptome/protéome 124

PARTIE 4 : Conclusions et perspectives générales 125

Références bibliographiques 129

Annexes 151
Annexe 1 151
Annexe 2 153
Annexe 3 154
Annexe 4 156
Annexe 5 158
Annexe 6 165
Annexe 7 166
Annexe 8 167
Annexe 9 168
Annexe 10 169
Annexe 11 171

ABREVIATIONS

2DE : Electrophorèse bidimensionnelle
2D-PAGE : Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide
ABP1: Auxin-binding protein
ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACN: Acétonitrile
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGPs: Arabinogalactan
AIA : Acide indole acétique
APX: Ascorbate peroxidise
ARG1: Altered Response to Gravity1
ARN: Acide rébonucléique
ARNm: Acide rébonucléique messager
ATP: Adénosine Triphosphate
ATPase: ATP synthase
AXR: Auxin resistant
bp: Paire de bases
BSA: Albumine sérique bovine
CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate
CTP: Cytosine Triphosphate
Cy3: Cyanine 3
Cy5: Cyanine 5
DNase: Désoxyribonucléase
dNTP: Désoxynucléotides triphosphate
DTT: Dithiothréitol
EAO: Espèce active de l'oxygène
EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA: Acide éthylène glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacétique
EST : Expressed sequence tag
GMPc: Monophosphate cyclique
grv2: gravitropism defective2
GTP: Guanine Triphosphate
HPLC: Chromatographie liquide haute performance
ICAT: Isotope Coded Affinity Tag
IEF: Focalisation isoélectrique
IP3: Inosito-1,4,5 triphosphate
IPG: Immobilized pH gradient
KDa: Kilo Dalton
LaT-B : Latrunculin B
LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
Lowess: Locally weighted scatter plot smoothing
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
Mr : Masse moléculaire
MS/MS: Spectrométrie de masse en tandem
NO: Oxyde nitrique
OEE: Oxygen evolving enhancer

PAS: Acide périodique-Schiff
pI : Point Isoélectrique
PIN2: PIN-FORMED2
POOCH: Cooper Chaperone
PTMs: Modifications post-traductionnelles
QTL : Quantitative trait loci
RNase: Ribonucléase
RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SAMs: S-adénosylméthionine synthase
SDS: Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sgr : Shoot gravitropism
SNR: Signal-to-noise ratio
SOD: Superoxide dismutase
TCA: Acide trichloroacétique
Tris: Tris (hydroxyméthyl)-méthylamine
Trx: Thioredoxine
UTP: Uracile Triphosphate

Introduction

INTRODUCTION

Le végétal ou l'arbre est soumis à des sollicitations mécaniques qui varient énormément tout au long de sa vie. Il est non seulement soumis aux conditions fluctuantes de l'environnement, mais son poids propre, les bras de leviers liés à la longueur des organes ainsi que sa prise au vent évoluent au cours de sa croissance. La fonction de soutien de l'arbre est active et couplée à la croissance. En effet, le dimensionnement de la structure mécanique des tiges (hauteur et diamètre) et l'enracinement se font, en partie, en réponse à des sollicitations mécaniques subies via le processus de thigmomorphogénèse. De plus, le contrôle du port se fait via des processus de redressement actifs qui impliquent le gravitropisme. La plasticité du couplage entre croissance et soutien permet un port durable et acclimaté à l'environnement mécanique.

Les tiges présentent une capacité à se redresser activement suite à une perturbation de leur inclinaison. Ce redressement, dit gravitropique, implique un processus de courbures locales dont le mécanisme est lié soit à une élongation différentielle dans les zones en croissance primaire, soit à la différentiation du bois de réaction dans les zones en croissance secondaire (Moulia et *al.*, 2006). Le bois de réaction est l'expression d'un tropisme de l'arbre vers une direction particulière. Chez les conifères, et lors de sa formation, le bois de réaction est plus "comprimé" que le bois normal et est appelé bois de compression. Chez les feuillus, il est beaucoup plus "tendu" que le bois normal d'où le nom de bois de tension. Ses précontraintes particulières et sa position dans un secteur angulaire opposé à du bois "normal" (siège d'une tension "normale") produisent une courbure de l'axe. Si les études sur le redressement gravitropique des zones en croissance primaire sur des plantules herbacées abondent (Moulia et *al.*, 2006), celles concernant la réponse gravitropique des axes ligneux en croissance secondaire sont beaucoup plus rares. Il a été montré qu'un redressement *via* un mécanisme de courbure implique nécessairement une dé-courbure d'une grande partie de la tige afin que celle-ci soit de nouveau rectiligne et verticale (Moulia, 2007). Cette contre courbure apparaît de manière anticipée avant que la tige ne dépasse l'axe vertical et n'est donc pas liée à un pur gravitropisme mais à une réaction par rapport à la forme de la tige, elle-même appelée autotropisme (Coutand et *al.*, 2007).

La perception des inclinaisons induites par la gravité, le vent ou les manipulations est un phénomène clé qui induit le redressement des tiges. Chez les arbres forestiers, les

mécanismes de perception de la gravité ne sont pas encore élucidés. Cependant, une analyse des études réalisées chez d'autres espèces peut apporter des éléments de réponse pour la compréhension de ces mécanismes. C'est pourquoi une telle analyse sera présentée dans la première partie de ce manuscrit. Chez les arbres forestiers, différentes phytohormones (parmi lesquelles l'éthylène et l'Acide Indole Acétique (AIA)) semblent intervenir lors des processus de formation du bois de réaction. Plomion et *al.* (2000) et Andersson-Gunneras et *al.* (2003) ont montré que l'ACC oxydase était sur-exprimée dans le bois de compression chez le pin maritime et dans le bois de tension chez le peuplier. De même, les travaux de Telewski et Jaffe (1986) sur des tiges de conifères soumises à une sollicitation mécanique (flexion ou inclinaison) ont montré l'augmentation simultanée de la production d'éthylène et la formation de bois de compression. Un modèle proposé par Little et Savidge (1987) décrit un rôle putatif de l'AIA au cours de la formation des bois de réaction. La formation des bois de réaction serait liée à une redistribution de l'AIA entre les deux faces de l'organe. Cependant, Hellgren et *al.* (2004) ont démontré que l'induction des bois de réaction dans la plante n'était pas due à une différence de concentration en AIA et que la redistribution de l'auxine n'était pas essentielle pour l'induction gravitationnelle des bois de réaction. Haga et Lino (2006) ont démontré que la décourbure (autotropisme) n'était pas régulée par une distribution asymétrique de l'auxine.

Le modèle d'étude choisi dans nos expériences est le peuplier. Peu de travaux à l'échelle moléculaire concernant le gravitropisme des ligneux ont été décrits. Le peuplier étant une plante ligneuse, il se redresse à la fois par des processus de croissance primaire au niveau des parties juvéniles, et secondaire dans les parties plus âgées, ce qui rend ce modèle particulièrement intéressant. Par ailleurs, le peuplier présente un intérêt économique indiscutable. La formation du bois de tension et les phénomènes associés constituent le défaut majeur des grumes de peuplier. Lorsque le bois de tension abonde, il induit des fentes à l'abattage, des variations dimensionnelles et des déformations au séchage, un état de surface à l'usinage incompatible avec les usages les plus valorisants. La problématique du bois de tension ne présente pas seulement un intérêt académique, mais également un intérêt commercial important (Jourez et *al.*, 2003). Il s'agit du premier arbre et de la troisième plante dont le génome est séquencé, ce qui rend possible l'identification éventuelle des gènes et des protéines impliqués dans le développement et le fonctionnement de cet arbre. Les connaissances acquises à partir de ce modèle pourront être éventuellement transposées à d'autres feuillus.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la réponse gravitropique chez les feuillus, nous avons mis en place une expérience sur des jeunes plants de peuplier inclinés ou non. Nous avons cherché à identifier les régulations précoces (45 min) ou plus tardives (une semaine) mises en place en réponse à l'inclinaison, et ceci dans les zones en croissance primaire (région apicale) et les zones en croissance secondaire (région basale) de la tige. Cette étude a été réalisée au niveau protéomique et partiellement au niveau transcriptomique.

Plan de la thèse

Le document est structuré en quatre parties :

- **La partie 1** correspond à une revue bibliographique, elle même divisée en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré aux différentes étapes du gravitropisme : la perception de la gravité, la transduction du signal, et la réponse gravitropique. Le second chapitre traite de l'intérêt de l'utilisation du peuplier pour les analyses du transcriptome et du protéome.
- **La partie 2** présente le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail. Nous verrons successivement la description du matériel végétal et des conditions de culture, les mesures réalisées pour caractériser la sollicitation mécanique, les méthodes utilisées dans l'analyse du transcriptome et du protéome.
- **La partie 3** regroupe les résultats et la discussion portant sur l'identification de gènes et de protéines régulés par un stress gravitationnel appliqué à de jeunes plantes en milieu hydroponique. Un premier chapitre présente la caractérisation du matériel végétal à différents stades de l'expérimentation par des techniques cytologiques (présence des amyloplastes et du bois de tension). Le deuxième chapitre porte sur les principaux résultats aquis par l'utilisation de la puce à ADN. Nous avons utilisé des microarrays de 15 000 gènes afin d'identifier les gènes régulés lors de la déformation de la tige au cours d'un stress gravitationnel. Le troisième chapitre présente sous forme de publication les résultats obtenus au niveau du protéome. Le quatérième chapitre porte sur le suivi en cinétique de l'expression de certains gènes codant pour des protéines d'intérêt identifiées par l'étude protéomique. Un certain nombre des protéines identifiées lors de l'analyse protéomique pouvant être potentiellement régulées par la thioredoxine, une étude complémentaire sur 2 thioredoxines (western blot, immunolocalisation *in situ*) est présentée. Finalement, le cinquième chapitre fera l'objet d'une discussion des résultats.
- **La partie 4** conclut ce travail et présente les perspectives.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Le gravitropisme

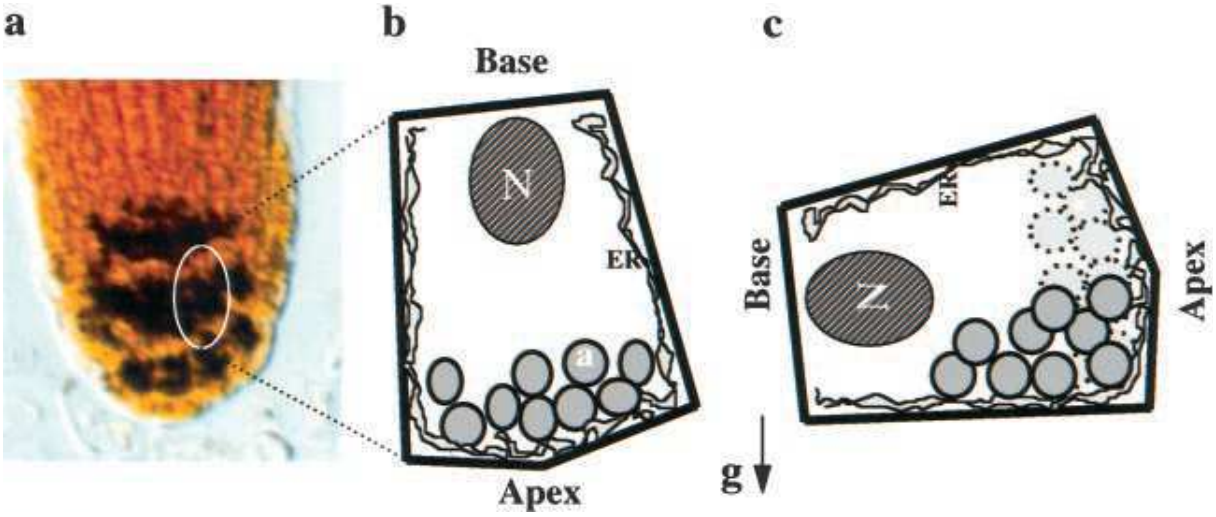


Figure 1: Mécanisme primaire de la perception de la gravité dans les racines, impliquant la sédimentation des amyloplastes dans les cellules collumaires de la coiffe racinaire. (a) Racine d'*Arabidopsis* en position verticale, montrant la sédimentation des amyloplastes (b) à la base de la cellule et à l'opposé du noyau. (c) Sous l'effet d'une stimulation gravitationnelle (réorientation de la racine en position horizontale) les amyloplastes sédimentent sur la face inférieure de la cellule en direction de la gravité (Chen et *al.*, 1999).

LE GRAVITROPISME

A. Gravitropisme

La croissance et le développement des plantes sont affectés par différents facteurs abiotiques environnementaux tels que la lumière, la température et l'eau. La croissance des organes de la plante est également fortement influencée par un stimulus physique, la pesanteur, qui permet d'assurer leur orientation correcte dans l'espace. En l'absence de ce vecteur (g) permanent, nous constatons que le cadre du corps de la plante est dérangé, et son équilibre physiologique est perturbé (Schnabl, 2002). Ainsi, au cours de l'évolution, les plantes ont développé un système approprié de réponse à la gravité selon une séquence « graviperception, transduction et transmission du signal, graviréponse ». En effet, l'inclinaison de l'organe doit être perçue par la cellule. Le signal physique est alors intégré par la cellule ; c'est la transduction du signal. Dans la période suivante, le signal biochimique est transmis jusqu'à la zone de réponse, où la courbure de la tige ou de la racine est initiée par une croissance différentielle des deux faces de l'organe (Volkmann et *al.*, 1986 ; Perbal et *al.*, 1997). Ainsi, la réponse à la gravité dans les organes est précédée par la perception, la transduction et la transmission du signal. Afin de comprendre la séquence des évenements physiologiques et biochimiques induits par la gravité dans les racines et les parties aériennes, de nombreux travaux ont consisté à placer les plantes ou leurs organites sous différentes conditions de forces gravitationnelles : hypergravité (centrifugeuse), et micropesanteur (clinostat lent), ou encore microgravité (vols spatiaux, navette et missions spatiales).

A.1 Perception de la gravité

Comment les plantes perçoivent-elles la pesanteur? Plusieurs hypothèses sont proposées. La plupart des travaux ayant conduit à l'élaboration de ces hypothèses ont été réalisés sur des racines de plantes herbacées.

A.1.1 Polarité des statocytes et rôle du cytosquelette

La zone de perception de la gravité dans la racine a été localisée dans les statocytes présents dans la columelle de la coiffe (Volkmann et *al.*, 1986 ; Sack, 1991). Les statocytes sont caractérisés par leur polarité structurale (figure 1) définie par la position du noyau du

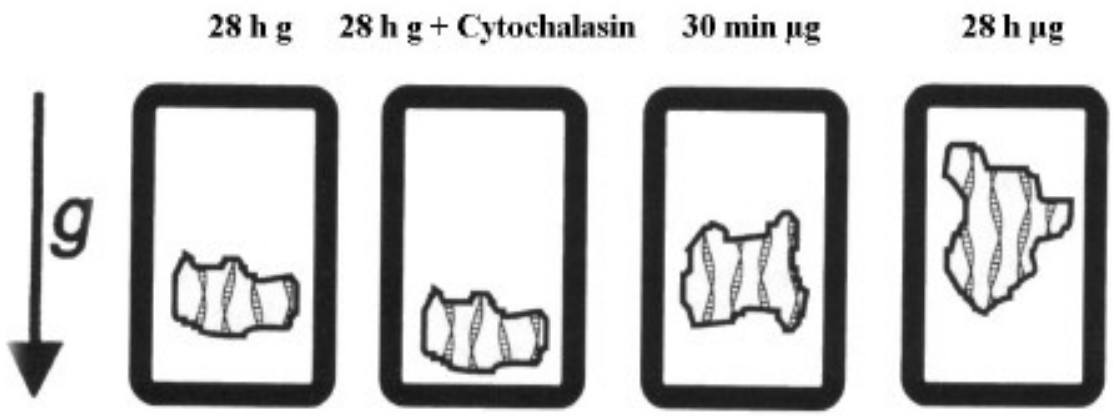


Figure 2: Schéma montrant la position d'un complexe de statolithes dans des statocytes de la coiffe racinaire de cresson soumis à différentes conditions expérimentales. (A) 28 h sous gravité 1g (contrôle), (B) 28 h sous gravité 1g avec Cytochalasine qui interrompt la polymérisation des filaments d'actine, (C) 30 min sous microgravité, (D) 28 h sous microgravité (Driss-Ecole et Perbal, 1999).

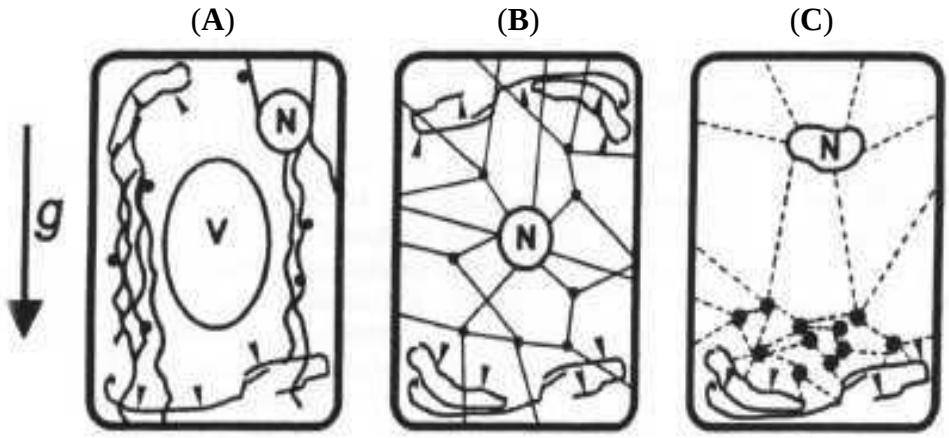


Figure 3: Schéma montrant les filaments d'actine dans des cellules racinaires de cresson (cytosquelette) d'une racine dans trois types de cellules ayant des fonctions différentes, (A) en élongation, (B) en division, (C) sous l'influence de la gravité ; la sédimentation des statolithes (points noirs) localisés dans un réseau de filaments d'actine, N = noyau, flèche = membrane, V = vacuole (Volkmann et Baluska, 2000).

côté proximal de la cellule, le réticulum endoplasmique (RE) du côté distal et les amyloplastes (ou statolithes) sédimentés au fond de la cellule (Chen et *al.*, 1999). Dans les parties aériennes, les statocytes contenant des amyloplastes sont associées aux cellules parenchymateuses entourant les tissus vasculaires (Sack, 1991). Sous l'effet de la gravité, les amyloplastes sédimentent sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) lorsque la racine est placée en position verticale (Sack, 1991 ; Fukaki et *al.*, 1998) (figure 1).

Lorsque la racine ou la tige sont inclinées, le déplacement des amyloplastes serait perçu par l'intermédiaire du cytosquelette dans les statocytes. Lors de l'inclinaison de l'organe, la polarité structurale des statocytes est modifiée, les amyloplastes se dirigent vers le côté proximal de la cellule, le noyau migre plus loin du côté proximal (Volkmann et *al.*, 1991 ; Perbal et *al.*, 1997). L'utilisation de la cytochalasine qui interrompt la polymérisation des filaments d'actine, inhibe le déplacement des statolithes (figure 2) (Buchen et *al.*, 1993).

Plusieurs études se sont focalisées sur le rôle du cytosquelette dans le gravitropisme des plantes (Sievers et *al.*, 1991 ; Baluska et Hasenstien, 1997 ; Yamamoto et Kiss, 2002 ; Blancaflor, 2002 ; Drobak et *al.*, 2004). Il a été suggéré que la chute des amyloplastes sur le cytosquelette déclenche l'ouverture de canaux dans la membrane plasmique conduisant à la réponse gravitropique (Blancaflor, 2002). Divers composants du cytosquelette jouent un rôle important dans la réponse gravitropique, probablement *via* leurs interactions avec les amyloplastes (figure 3) (Sievers et *al.*, 1991 ; Baluska et Hasenstein, 1997). Cependant, l'interaction n'est pas totalement comprise (Blancaflor, 2002 ; Yamamoto et Kiss, 2002). Les changements d'organisation des microtubules pendant la réponse gravitropique, ont été bien étudiés, mais la signification des changements de leur orientation dans le contrôle de la croissance différentielle n'est pas claire (Blancaflor, 2002). Les études utilisant des approches pharmacologiques, pour montrer le rôle du cytosquelette dans le gravitropisme, ont apportés des résultats contradictoires et, par conséquent, ont besoin d'être interprétés avec prudence (Blancaflor, 2002). Par exemple, l'inhibition de la polymérisation de microfilaments dans la coiffe de la racine de maïs se traduit par une augmentation de sensibilité à la gravité, et les racines traitées montrent une forte réponse gravitropique (Hou et *al.*, 2003). De plus, il a été confirmé que la réponse gravitropique de la tige d'*Arabidopsis* n'est pas inhibée par le traitement avec Latrunculin B (LaT-B) qui permet la rupture du cytosquelette (Morita et Tasaka, 2004). Dans les cellules endodermiques de tige traitée par LaT-B, le mouvement des

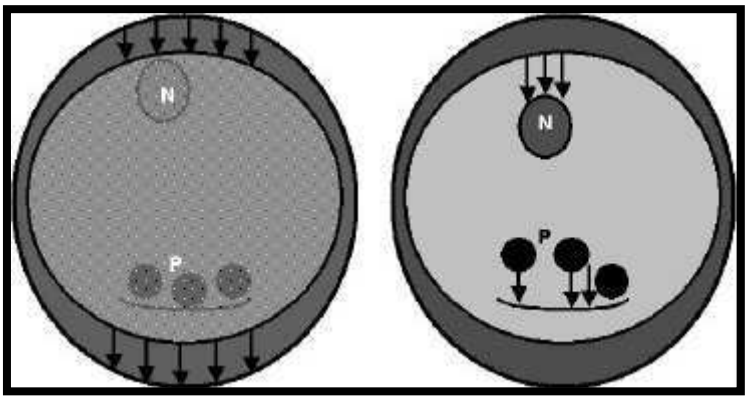


Figure 4: Deux modèles pour la perception de la gravité: à gauche, la masse entière de la cellule produit une tension/compression pour induire la transduction du signal ; à droite, les organites intracellulaires comme les plastides (P) fonctionnent comme facteur de masse, ils sont attachés à la membrane plasmique *via* le cytosquelette, créant ainsi une tension sur des récepteurs du réticulum endoplasmique (RE) (Sack, 1997).

amyloplastes en réponse à la stimulation gravitationnelle a été observé malgré la disparition du réseau d'actine (Morita et Tasaka, 2004).

A.1.2 Rôle du protoplaste

Les mutants dont les statocytes contiennent une quantité réduite d'amidon dans les amyloplastes ont une croissance tout à fait normale, mais sont moins sensibles au stimulus gravitropique que les plantes sauvages (Kiss et Sack, 1989 ; Kiss et *al.*, 1996). Des mutants d'*Arabidopsis* totalement dépourvus d'amidon ne s'orientent pas dans la direction du champ de gravité lorsqu'ils sont placés dans des conditions normales, alors que, lorsqu'ils sont placés dans un champ de gravité plus intense, ils s'orientent selon la direction du champ de gravité (Kiss et *al.*, 1997 ; Fukaki et *al.*, 1998). Il semble donc qu'un autre mécanisme de perception, moins sensible que celui lié à la sédimentation des amyloplastes, intervienne lors de la réponse gravitropique. La masse entière du cytoplasme peut participer à la perception de la gravité (Wayne et *al.*, 1990). Du fait du poids du protoplaste, la tension et la pression existant entre la membrane plasmique et la paroi ne seraient pas égales sur les différentes faces de la cellule, ce qui fournirait ainsi une information sur la direction du champ de gravité (Wayne et Staves, 1996) (figure 4). Un autre modèle postule que la masse intracellulaire des plastes (Sack, 1991 ; Sack, 1997), exerce une tension sur des récepteurs membranaires (figure 4). Staves et *al.* (1997) et Wayne et Staves (1996) proposent une perception de la gravité par des récepteurs de la membrane plasmique, les integrines, couplant la matrice extracellulaire et les composés intracellulaires.

A.1.3 Rôle de la vacuole dans les tiges

Contrairement aux cellules de la coiffe racinaire qui se caractérisent par un cytoplasme abondant et de petites vacuoles, les cellules parenchymateuses de la tige se caractérisent par une grande vacuole centrale. L'analyse génétique des mutants "*shoot gravitropism*"(*sgr*) a suggéré que la vacuole contribue à la perception de la gravité en affectant la sédimentation des amyloplastes (Morita et Tasaka, 2004). Les mutants, *sgr2*, *sgr3*, *zig (zigzag)/sgr4* et *grv2 (gravitropism defective2)/sgr8* ont montré une réponse gravitropique de leurs tiges reduite (Kato et *al.*, 2002 ; Yano et *al.*, 2003 ; Silady et *al.*, 2004). Parmi ces mutants, un défaut cellulaire commun a été observé : une localisation anormale des amyloplastes dans les cellules parenchymateuses de la tige. En effet, chez les mutants *sgr*, les amyloplastes ne

sédimentent pas, ils semblent être plaqués à la membrane plasmique, en périphérie de la cellule (Morita et *al.*, 2002 ; Yano et *al.*, 2003 ; Silady et *al.*, 2004). Dans les cellules parenchymateuses de type sauvage, les amyloplastes sédimentent, et semblent traverser la vacuole. Des observations en microscopie électronique les montrent entourés de cytoplasme et de membrane vacuolaire (Morita et *al.*, 2002).

A.2 Transduction du signal

La transduction du signal est la conversion d'une forme de signal (ionique/mécanique/thermique) en une autre. Ce second signal peut être ensuite transmis à un organe cible. L'ordre des évennements de signalisation qui se produisent après la perception n'est pas clair, bien que certains des acteurs aient été identifiés (Blancaflor, 2002). Certains de ces acteurs identifiés dans la transduction du signal gravitropique sont présentés ici.

A.2.1 les messagers secondaires

Comment la sédimentation des amyloplastes est elle transformée en un signal physiologique conduisant à la courbure des organes ? Cette question demeure ouverte. L'interaction entre les amyloplastes et les microfilaments dans les statocytes n'a pas encore été complètement démontrée, mais l'association des statholites avec des microfilaments de myosine a été proposée (Wunsch et Volkmann, 1993). Il semble que les mouvements des amyloplastes produiraient des tensions dans les microfilaments. Ces tensions se propageraient le long des filaments jusqu'à la membrane, produisant ainsi l'activation des canaux sensibles à la déformation. Plusieurs messagers secondaires tels que le Ca^{2+}, l'inositol-1,4,5 trisphosphate (IP3) et le pH ont été identifiés dans la transduction du signal gravitropique.

L'activation des canaux mecano-sensibles lors de la chute des amyloplastes permettrait l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule, ce qui représenterait le signal biochimique du gravitropisme (Seivers et *al.*, 1991). En effet, les chélateurs de calcium comme EGTA, ou l'EDTA, arrêtent la courbure gravitropique dans les racines de maïs et l'ajout de calcium restaure la réponse (Lee et *al.*, 1983 ; Björkman et Cleland, 1991). De plus, il a été montré que des modulations du niveau de Ca^{2+} sont nécessaires pour produire des gradients d'auxine à travers des organes gravistimulés, ces gradients conduisant à la courbure et à la croissance

différentielle de l'organe (Masson, 1995). Cependant, d'autres expériences ne confirment pas que la gravité induit les changements transitoires du Ca^{2+} (Legué et *al.*, 1997).

La calmoduline, protéine régulatrice dépendante du Ca^{2+}, est impliquée dans la perception et la transduction du signal. En réponse à la gravité, le taux du calmoduline dans l'apex de la racine est élevé (Sinclair et *al.*, 1996). L'application des antagonistes du calmoduline dans des racines de maïs retarde la réponse gravitropique (Stinemetz et *al.*, 1992).

L'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3), a également été mis en évidence dans la réponse gravitropique des plantes (Swatzell et *al.*, 1999 ; Ranjeva et *al.*, 1999). L'IP3 est produit par la phospholipase C, qui clive le phosphatidyl inositol 4, 5 bisphosphate en 1, 2 diacylglycerol et IP3. Ce dernier libère le Ca^{2+} intracellulaire en activant des canaux calciques de la vacuole ou du RE (Chen et *al.*, 1999). Une synthèse d'auxine dépendante de l'IP3 a été montrée par Ettlinger et Lehle (1988). L'activité d'une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'IP3, la phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase est augmentée du côté inférieur du pulvini de maïs 10 sec après gravistimulation (Perera et *al.*, 1999). Les auteurs suggèrent que l'IP3 est fortement impliqué dans la transmission du signal de la gravité des cellules de la zone de perception aux cellules de la zone répondante (Seivers et *al.*, 1991 ; Perera et *al.*, 2001).

Le pH cytosolique dans les cellules de la columelle de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis* est modifié moins d'une minute après la gravistimulation (Scott et Allen, 1999 ; Fasano et *al.*, 2001). En réponse aux changements de pH cytosolique, l'apoplaste de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis* est acidifié 2 min après une stimulation gravitationnelle. Ces changements de pH précèdent la croissance de la paroi dans la zone d'élongation (Fasano et *al.*, 2001).

Récemment, Hu et *al.* (2005) ont découvert que la molécule d'oxyde nitrique (NO) et le GMPc pourraient intervenir dans la transduction du signal gravitropique dans la racine de soja (*Glycine max*). En effet, l'inhibition de la synthèse de (NO) par la NO synthase ou par des inhibiteurs de nitrate réductase provoque une réduction de la courbure gravitropique. La réponse gravitropique est induite non seulement par l'absence de NO mais aussi par l'inhibition de l'activité guanylyl cyclase (enzyme activée par le NO qui provoque l'accumulation de Guanosine 3',5' monophosphate cyclique (GMPc). Par ailleurs, l'auxine induit une accumulation asymétrique de NO dans la pointe de la racine, et au cours de la

stimulation gravitationnelle le NO et l'auxine induisent l'accumulation de GMPc. La réponse gravitropique et l'accumulation asymétrique de NO sont inhibées par les inhibiteurs de transport de l'auxine.

Chang et *al.* (2003) ont montré l'importance d'une protéine soluble de 50 KDa dans la transduction du signal gravitationnel dans la tige d'avoine. Cette protéine montre une phosphorylation différentielle entre le côté inférieur et supérieur de pulvini d'avoine après 5 min de gravistimulation.

A.2.2 Rôle du gène ARG1

Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la transduction de la gravité (Yamauchi et *al.*, 1997 ; Wyatt et *al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, les mutants *arg1*, *sgr1* et *rhg* (*root and hypocotyl gravitropism*) montrent une réponse gravitropique réduite, respectivement dans les racines, tiges et hypocotyles (Tasaka et *al.*, 1999). La distribition intracellulaire de ARG1/RHG et l'effet de Brefeldin A (inhibiteur de la secretion de la membrane plasmique) sur ces distribitions, suggèrent que cette protéine réside au niveau de plusieurs systèmes endomembranaire, tels que le RE, et l'appareil de Golgi (Boonsirichai et *al.*, 2003). Les analyses moléculaires indiquent que le gène *ARG1* code pour une protéine transmembranaire de type DnaJ (Chen et *al.*, 1998 ; Rosen et *al.*, 1999 ; Sedbrook et *al.*, 1999). La protéine ARG1/RHG est à la fois associée à la membrane et à l'actine (Sedbrook et *al.*, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que le gène *ARG1* chez *Arabidopsis* code pour un composant du transporteur d'efflux de l'auxine qui est médiateur de la réponse gravitropique dans la racine (Chen et *al.*, 1998). L'identification des protéines qui réagissent avec ARG1 devrait fournir des indices importants pour comprendre le rôle de cette protéine dans la régulation du gravitropisme.

A.3 La réponse gravitropique : La courbure des organes

A.3.1 Modulation des réponses gravitropiques induites par l'auxine

Dans les organes à croissance primaire, la courbure vers le bas des racines et vers le haut des parties aériennes des plantes en réponse à la gravité est corrélé à une accumulation élevée d'auxine le long du côté inférieur. Dans les racines, l'auxine fonctionne comme

inhibiteur de croissance et d'élongation de cellules, la conséquence étant une courbure vers le bas. En revanche, la courbure vers le haut des parties aériennes est induit par l'effet stimulateur de l'auxine (Evans et Ishikawa, 1997). D'après la théorie classique de Cholodny et Went, l'auxine est transportée latéralement et accumulée sur le côté inférieur du tissu répondant à la gravité (Cholodny, 1927 ; Went et Thimann, 1937).

Cependant, ce modèle de recourbement racine/partie aérienne est trop simple pour expliquer le spectre complexe de la réponse gravitropique. En particulier, Schnabl (2002) a montré que la courbure gravitropique s'établit sans gradient d'auxine. De plus, les racines de maïs traitées par les inhibiteurs de l'auxine ont toujours une réponse gravitropique (Ischikava et Evans, 1993). Ces observations indiquent que la croissance différentielle induite par la gravité peut être également provoquée par la croissance asymétrique *via* des mécanismes indépendants de l'auxine.

L'importance de la modulation du transport polaire de l'auxine pour expliquer la réponse gravitropique a été montrée par différents travaux. Bennett et *al.* (1996) et Yamamoto et Yamamoto (1998) ont identifié un gène *AUX1* chez *Arabidopsis*, codant pour un transporteur d'influx d'auxine dans les racines. Les mutants pour ce gène ont montré une sensibilité réduite à l'auxine, les racines étant agravitropiques. Des gradients localisés d'auxine liés à un efflux de l'hormone se développent grâce aux protéines PIN, régulatrices de l'efflux de l'auxine, qui sont disposées asymétriquement dans leurs cellules. Le gène d'*Arabidopsis AGR1*/*EIR1*/*PIN2* a été cloné et s'est avéré essentiel pour le gravitropisme de la racine (Chen et *al.,* 1998 ; Müller at *al.,* 1998 ; Utsuno et *al.,* 1998). Il code pour un transporteur d'efflux d'auxine exprimé la plupart du temps dans les racines (Chen et *al.,* 1999). La protéine est localisée dans la membrane basale des cellules corticales et épidermiques de la zone d'élongation distale (DEZ) et centrale (CEZ) (Müller et *al.*, 1998). Friml et *al.* (2002) ont montré que PIN3 est exprimé dans les cellules de la columelle de la coiffe racinaire et les cellules épidermiques de la partie aérienne.

Dans les racines en position verticale, PIN3 est distribuée uniformément dans les cellules de la columelle. Cette protéine, est relocalisée du côté inférieur de la cellule lorsque les racines sont placées horizontalement, et ceci au cours des 5 min suivant la stimulation. Dans les racines inclinées de 90° par rapport au vecteur de la gravité, PIN3 se trouve relocalisée du côté inférieur de la cellule. Dans cette position, PIN3 serait capable

d'augmenter la distribution de l'auxine du côté inférieur de la coiffe racinaire. Cette relocalisation de PIN3 est maintenue pendant 20 min puis disparait après 1 heure. La relocalisation de PIN3 en réponse à la gravistimulation est inhibée par LaT-B connu pour perturber le réseau d'actine. La déstructuration du réseau d'actine avec LaT-B provoque aussi une accumulation rapide de PIN3 dans le cytoplasme. Il est vraisemblable que la flexibilité de ce système de transport soit liée à un recyclage constant de ces protéines au niveau de la membrane *via* un système actine-dépendant, ce qui permet, en conséquence, de piloter la direction de l'exportation en jouant sur le site d'insertion de ces protéines dans la cellule émettrice.

Au niveau des cellules épidermiques de la tige et de l'hypocotyle, PIN3 a été localisée dans la membrane plasmique, elle est distribuée asymétriquement non pas à la base de la cellule comme PIN1 et PIN2, mais plutôt longitudinalement (Moore, 2002). Friml et *al.* (2002) suggèrent que la protéine PIN3 contrôle le transport latéral de l'auxine entre les cellules vasculaires centrales et aux alentours des cellules corticales et épidermiques, qui accumulent des concentrations différentielles d'auxine pendant la réponse gravitropique. Dans une tige gravistimulée, les amyloplastes se déposeraient vers la membrane contenant la protéine PIN3 (Moore, 2002).

Comme mentionné précédemment, l'auxine a un effet inhibiteur sur la croissance des cellules dans la racine et un effet stimulateur sur l'élongation des cellules dans la partie aérienne. L'identification des gènes induit par l'auxine, qui sont exprimés en réponse à la gravité pourrait fournir des informations sur le mécanisme impliqué. Il apparaît que l'auxine régule l'élongation cellulaire en modulant l'activité de la pompe à protons de la membrane plasmique, en affectant l'extensibilité de la paroi et l'exocytose cellulaire, et par la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes sensibles à l'auxine (Jones, 1994). Bien que des protéines de la paroi cellulaire, de la membrane plasmique, cytoplasmiques, et nucléaires aient été trouvées liées à l'auxine, une seule, applée ABP1, pourrait jouer le rôle de recepteur d'auxine dans le contrôle de l'expansion cellulaire (Hobbie, 1998 ; Jones et *al.*, 1998). ABP1 "auxin-binding protein", se trouve principalement dans le RE, bien qu'elle ait aussi été trouvée en dehors de la cellule. Des expériences de surexpression de ABP1 dans des plantes de tabac et de maïs montrent qu'ABP1 pourrait moduler l'activité de la pompe à protons de la membrane plasmique (Ephritikhine et *al.*, 1987) et promouvoir l'expansion des cellules (Jones et *al.*, 1998). De nombreuses études de la régulation de l'expression de différents gènes

par l'auxine ont été réalisées (Guilfoyle et *al.*, 1998). Parmi ces gènes, AXR1 (Auxin resistant 1) et AXR3 pourraient jouer un rôle dans la réponse gravitropique (Leyzer et *al.*, 1996 ; Del-Pozo et *al.*, 1998 ; Chen et *al.*, 1999). Les espèces activées de l'oxygene (EAO) induites par l'auxine pourraient jouer un rôle dans le gravitropisme de la racine de maïs (Joo et *al.*, 2001).

A.3.2 Réponse des organes à croissance secondaire

Dans le cas des organes à croissance secondaire, lorsque l'exposition au stimulus gravitationnel se prolonge au-delà du temps de présentation, les cellules filles issues du cambium, se différencient pour former après plusieurs jours, des fibres particulières appelées fibres G. Une partie ou la totalité de la paroi secondaire de ces fibres est presque exclusivement composée de cellulose. Au cours de la différenciation, la fine membrane de la nouvelle cellule va s'épaissir et se renforcer par des dépôts ligno-cellulosiques pour former la cellule adulte. Lors de la maturation, dernière phase du processus de différenciation, quand la fibre a déjà acquis ses dimensions finales, elle aurait tendance à se contracter longitudinalement (Hejnowicz, 1967 ; Moulia et *al.*, 2006). Ces déformations sont bloquées par l'adhérence de la jeune cellule au cylindre massif de bois rigide déjà existant. Ainsi, la nouvelle cellule se retrouve en précontrainte de tension suivant la direction longitudinale et ce d'autant plus fortement dans le bois de tension (Clair et *al.*, 2006). Pour que la structure soit en équilibre, ces tensions en périphérie de l'axe vont être compensées par une mise en compression des cellules déjà présentes. Ainsi, par l'addition au cours du temps de nouvelles couches de cellules, les cellules initialement en tension lorsqu'elles étaient en périphérie, vont peu à peu être compressées (Hejnowicz, 1967 ; Moulia et *al.*, 2006). Ainsi, des forces internes appelées contraintes de maturation, apparaissent dans le bois lors de sa maturation (Fournier et *al.*, 1994). Le bois de réaction présente des niveaux de précontraintes beaucoup plus importants que le bois normal. Il est toujours produit sur un seul côté de l'axe, ainsi la différence de contraintes entre les deux faces va induire un moment fléchissant qui va permettre de redresser l'axe. Pour Fisher et Stevenson (1981), le redressement des axes est lié à la distribution des fibres gélatineuses (fibres G caractéristiques du bois de tension) très riche en cellulose sur la face supérieure d'un axe incliné. Ils suggèrent que le bois de tension peut jouer un rôle endogène actif dans la mise en place de l'architecture de la plante. Mais le redressement peut s'installer sans la présence de fibres G dans certaines espèces (Fisher et Mueller, 1983). Le séquençage systématique d'EST a permis d'identifier des gènes qui semblent spécifiquement exprimés dans le bois de tension tels que plusieurs gènes codant

pour des protéines à arabinogalactanes. Ces protéines à arabinogalactanes s'accumulent fortement en périphérie de la paroi des fibres-G, ce qui suggère un rôle particulier pour ces protéines dans la formation de ces fibres atypiques. Néanmoins, la fonction précise de ces protéines dans la formation du bois de tension est inconnue.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre II : Le peuplier plante ligneuse modèle

LE PEUPLIER PLANTE LIGNEUSE MODÈLE

A.Le peuplier plante ligneuse modèle

Le peuplier est un excellent modèle pour étudier les mécanismes fondamentaux gouvernant les traits de vie caractéristiques des arbres (formation du bois, longévité, gigantisme) et les processus qui déterminent leurs propriétés technologiques (qualité des fibres et du bois). L'accès à la séquence génomique du peuplier a ouvert des perspectives considérables dans l'analyse de ces mécanismes au niveau moléculaire ainsi que dans l'identification des réseaux géniques impliqués dans le développement et le fonctionnement de cet arbre. Ainsi, les connaissances acquises à partir de ce système modèle pourront servir à mieux comprendre le développement et le fonctionnement d'autres espèces d'arbres conduisant à une meilleure maîtrise de leurs propriétés sylvicoles et biotechnologiques (Martin et Kohler, 2004).

Le peuplier présente les avantages d'être à la fois un modèle approprié pour la recherche expérimentale et une espèce d'importance économique en sylviculture (Klopfenstien et *al.*, 1997). Le genre *Populus* appartient à la famille des salicacées et comporte environ 29 espèces qui sont localisées dans l'hémisphère nord et sont classifiées dans cinq sections (Turanga, Leucoides, Aigeiros, Tacamahaca, et Populus) (Eckenwalder, 1996). Le peuplier offre plusieurs avantages comme arbre modèle : développement rapide, propagation facile et transformation génétique possible (Klopfenstien et *al.*, 1997). Des protocoles de multiplication végétative et de transformation génétique efficaces, basés sur *Agrobacterium* ont été appliqués avec succès dans les sections, Leuce, Tacamahaca et Aigeiros (Kim et *al.*, 1997 ; Han et *al.*, 1997 , 2000). Des cartes génétiques ont été faites pour plusieurs espèces de peuplier (Bradshaw et *al.* 1994 ; Cervera et *al.*, 2001 ;Yin et *al.*, 1999) et peuvent être employées pour l'analyse quantitative (QTL) et le clonage (Wu et Stettler,1994 ; Wu et *al.*, 1997 ; Frewen et *al.*, 2000).

A.1 Séquençage du génome du peuplier

En 2006, un consortium international publie la première séquence complète du génome d'un arbre, le peuplier *Populus trichocarpa* (espèce nord-américaine), et l'analyse de ses caractéristiques principales (Tuskan et *al.*, 2006). Il s'agit de la troisième plante dont le

génome est séquencé après l'arabette *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) et le riz *Oryza sativa* (Goff et *al.*, 2002).

L'ADN du génome du peuplier a été découpé en fragments de tailles variables et les séquences de plus de 7 000 000 de ces fragments sont disponibles (http://genome.jgi-psf.org/poplar0/poplar0.home.html). Les séquences contiguës ont été ensuite reconstruites par recouvrement, à l'aide de logiciels puissants, afin de reconstituer l'agencement initial des 19 chromosomes. Après l'analyse de la séquence ainsi assemblée et la recherche des régions codantes, réalisées simultanément à l'aide de modèles informatiques, les généticiens ont établi l'existence de 46 000 gènes. Ce nombre est deux fois supérieur à celui d'*Arabidopsis* et voisin de ceux estimés chez le riz et l'homme.

Le travail de séquençage du génome du peuplier conduit à présent à l'analyse de sa structure génomique et des fonctions précises des gènes répertoriés. Ces travaux contribuent à la compréhension du fonctionnement des arbres et des écosystèmes forestiers et participent ainsi au développement de la filière « bois-énergie ». Plus de 70% de gènes inventoriés ressemblent fortement à ceux d'*Arabidopsis* et des autres végétaux. Le reste (30%) ne présente pas de similitude avec des gènes et protéines végétales répertoriés (Tuskan et *al.*, 2006). Cet ensemble de gènes est vraisemblablement nécessaire au développement et au fonctionnement spécifique des arbres. Les résultats détaillés de l'annotation du génome, c'est-à-dire l'attribution de fonctions précises correspondant à certains gènes, sont présentés dans le journal *Science* du 15 septembre 2006 (Tuskan et al, 2006).

L'analyse de la structure du génome du peuplier montre que l'arbre a subi deux duplications complètes du génome : la première correspond à la séparation des lignées ancestrales du genre *Populus* et *Arabidopsis* il y a 100 à 120 millions d'années. La seconde, plus récente (8 à 13 Ma), a laissé pour témoignage 8000 paires de gènes dupliqués toujours présents (Tuskan et *al.*, 2006). La comparaison avec le génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 13,019 paires de gènes orthologues (identifiés par l'outil BLAST). De plus, le peuplier possède en moyenne 1,6 gènes putatifs homologues codant pour les mêmes protéines, alors que chez *Arabidopsis*, en estime cette moyenne à 1,4 (Tuskan et *al.*, 2006). Cependant, la fréquence relative des domaines protéiques reste identique chez les deux espèces végétales. Enfin, sur un plan plus dynamique, les substitutions nucléotidiques, les duplications des gènes en tandem et les épisodes de réarrangement chromosomique s'opèrent plus lentement chez *Populus trichocarpa*. Les gènes sur-représentés chez *Populus*

trichocarpa sont impliqués dans la biosynthèse de la paroi lignocellulosique, dans le développement méristématique, dans la résistance aux maladies et dans le transport des métabolites (Tuskan et *al.*, 2006).

A.2 Analyse de l'expression du génome

L'analyse de l'expression de l'ensemble des transcrits (transcriptome) et des protéines (protéome) sont des stratégies très performantes pour permettre une analyse pratiquement exhaustive de l'expression de l'ensemble des gènes et des protéines dans une condition donnée.

Il s'agit, dans la pratique, de comparer l'expression des gènes/protéines au sein d'un même organisme, dans des états physiologiques contrastés. Les informations obtenues permettent de déterminer l'ordre et les conditions d'expression des gènes et eventuellement de définir un rôle de ces gènes dans le processus étudié.

A.2.1 Etude du transcriptome

Grâce aux programmes de séquençage à très haut débit, les biologistes ont à leur disposition un catalogue quasi exhaustif des composants du génome pour une trentaine d'espèces parmi lesquelles quelques eucaryotes (Arabette, Riz, Peuplier, homme…). Les approches regroupées sous le terme *génomique* visent à exploiter cette base de connaissance afin d'étudier comment les gènes fonctionnent et interagissent dans les cellules et les organismes qui les portent.

De nouvelles technologies engendrées par cette révolution sont utilisées pour quantifier les ARN messagers, collectivement appelés *transcriptome,* présents dans un échantillon biologique (culture cellulaire, tissu ou individu). Bien que les ARNm ne constituent qu'une étape de l'expression des gènes, leur abondance est souvent corrélée à l'activité des protéines codées et leur quantification en parallèle est plus aisée à conduire que celle des protéines (Lockhart et Winzeler, 2000). Pour les organismes dont le génome a été séquencé, l'analyse parallèle de l'expression d'un grand nombre de gènes peut être réalisée

via l'identification d'étiquettes provenant des transcrits extraits de l'échantillon biologique étudié.

A.2.1.1 Principaux types de puces à ADN et applications chez les végétaux

Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « DNA microarray » en anglais (de « array » = rang ordonné), est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que celui du Southern blot ou du northern blot, technologies couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif (Southern, 1975). La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots » (de l'anglais spot=tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « macroarrays » par opposition aux « microarrays »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées dans la figure 5.

Bien que l'utilisation des puces à ADN soit relativement récente dans le domaine végétal (Schena et *al.*, 1995), plus d'une centaine de travaux englobant un choix très large d'application ont été publiés à ce jour (voir notamment www virtual library (Botany) Plant-Arrays, http://www.univ-montp2;fr/~plant-arrays). A la suite des premiers travaux menés chez *Arabidopsis* pour analyser différents organes (Schena et *al.*, 1995 ; Ruan et *al.*, 1998),

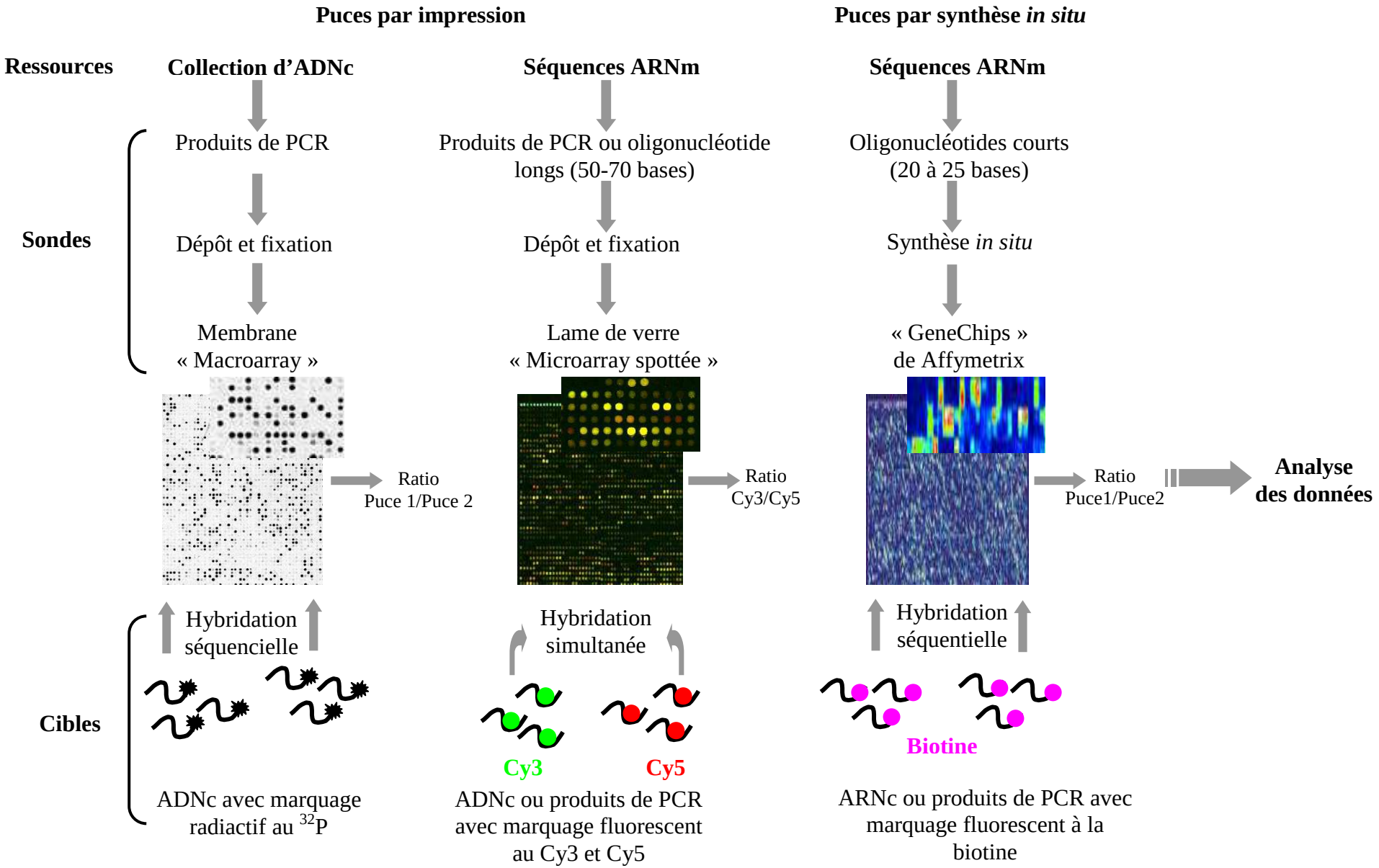


Figure 5: Principaux types de puces à ADN

différentes lignées (Kehoe et *al.*, 1999) ou conditions environnementales (Desprez, et *al.*, 1998), les puces à ADN ont très rapidement trouvé des applications plus immédiates chez d'autres espèces d'intérêt agronomique comme la fraise (Aharoni et *al.*, 2000). De plus, d'ambitieux programmes génomiques principalement orientés sur les espèces modèles Arabidopsis, riz et peuplier (Wisman et Ohlrogge, 2000 ; Gai et *al.*, 2000 ; Smith et *al.*, 2004) se sont traduits par la mise en place de plates-formes transcriptomiques dédiées aux plantes qui offrent la possibilité d'utiliser des puces dédiées à une espèce et développées par ces plates-formes ou de concevoir des puces spécialisées.

A.2.1.2 Le transcriptome de peuplier

Le consortium public international, *l'Internationa Poplar Genome Consortium* (IPGC, http://www.ornl.gov/sci/ipgc/home.htm) a constitué plusieurs collections d'ESTs (plus de 220 000) qui sont exprimés dans différents organes du peuplier (racines, bois, feuilles, fleurs, …) ou dans diverses situations physiologiques (croissance, carences nutritionnelles, stress hydrique,…) (Sterky et *al.*, 1998). Elles sont disponibles dans les banques publiques de données. La compilation de ces ESTs par Per Unneberg (Université de Stockholm) et l'Umea° *Plant Science Center* (UPSC ; Université de Umea°) a permis d'identifier plus de 30 000 gènes différents, soit 65 % des gènes potentiels du peuplier (Martin et Kohler, 2004). Plus de 10 000 ESTs de plusieurs types de racines (adventives, latérales, ectomycorhizées) ont été caractérisés dans différentes situations physiologiques (Kohler et *al.*, 2003). L'INRA d'Orléans a généré en collaboration avec l'INRA de Nancy une puce portant 15 000 ESTs de plusieurs tissus impliqués dans la formation du bois et, en particulier, le cambium (Leplé et *al.*, 2004). Toutes les protéines d'*Arabidopsis thaliana* ont été identifiées chez le peuplier avec des taux de similarité plus ou moins conservés (Martin et Kohler, 2004).

Ces collections d'ESTs sont également utilisées afin de construire des microréseaux d'ADNc (*microarrays* ou puces à ADNc). Il s'agit d'imprimer plusieurs milliers d'ADNc, ou des oligonucléotides de 20 ou 70 bases (Gene Chips), sur une surface de quelques dizaines de mm^2 de nylon ou de verre. Un microréseau regroupant l'ensemble des ESTs (à peu près 20 000) de peuplier, produits dans les laboratoires de l'INRA d'Orléans et de Nancy (projet Lignome, http://www. Pirreton.inra.fr/Lignome/), a été élaboré en collaboration avec le Centre de Ressources Génomiques PICME de Seibersdorf (Autriche). Ces microréseaux

d'ADN sont utilisés dans l'analyse de l'expression simultanée des ensembles de gènes à des stades de développement variés (croissance méristimatique, floraison, enracinement, activité cambiale, formation du bois, sénescence foliaire) et dans des conditions physiologiques contrastées (sécheresse édaphique, stress froid, carence nutritionnelle, attaques parasitaires, symbioses ectomycorhiziennes) (Kohler et *al.*, 2003 ; Hertzberg et *al.*, 2001 ; Andersson et *al.*, 2004). L'analyse du transcriptome du peuplier lors d'une sécheresse ou de l'interaction avec l'agent de la rouille foliaire a permis de mettre en évidence les principales fonctions cellulaires régulées dans le système racinaire ou les feuilles lors de ces contraintes abiotiques et biotiques (Martin et Kohler, 2004). La transcriptomique facilite ainsi la sélection de gènes candidats méritant une analyse fonctionnelle plus poussée.

Enfin, cette collection importante d'EST est indispensable à l'identification des protéines séquencées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS/MS).

A.2.1.3 Limitations des puces à ADN et nouvelles orientations

Une des limitations majeures de l'analyse des transcrits par les puces à ADN concerne les événements de régulation post-transcriptionnelle car ils sont rarement détectés à travers l'analyse des profils d'expression des gènes. De nombreux processus de réponse font intervenir des interactions protéines-protéines ou des modifications post-traductionnelles d'enzymes sans qu'il y ait la moindre variation de l'activité transcriptionnelle des gènes correspondants. Une autre limitation des approches transciptomiques concerne les niveaux d'expression des membres d'une famille de gènes où ceux-ci ne peuvent être quantifiés d'une façon fiable par la présence de similarités dans les séquences conservées (Richmond et Somerville, 2000 ; Schenk et *al.*, 2000). De plus, la sensibilité de détection des gènes faiblement exprimés est problématique. En conditions normales, les analyses par puces à ADN sont capables de détecter des transcrits dont l'abondance relative est de 1/100 000 ARNm. Cependant, pour des raisons liées aux analyses de données, dans la plupart des cas, ces gènes sont systématiquement éliminés car, en limite de seuil de détection, ils présentent une grande variabilité. Une des limitations majeures des puces à ADN, la quantité d'ARN requise (de l'ordre de 1 à 2 µg d'ARN polyA, classiquement) est en passe d'être levée avec l'apparition de nouvelles technologies (systèmes d'hybridation de *microarrays* notamment) qui ne nécessitent plus que de l'ordre de 1 à 2µg d'ARN totaux pour obtenir les mêmes résultats. Cependant, une telle quantité reste difficilement accessible lorsque l'on souhaite

analyser les profils d'expression de tissus ou d'assises cellulaires et même d'organe de petite taille.

Une des perspectives les plus intéressantes est la comparaison des informations collectées au niveau du transcriptome, du protéome (analyse de l'ensemble des protéines d'une cellule) et du métabolome (analyse de l'ensemble des métabolites d'une cellule). Cette intégration commence à apparaître chez la levure et permet de créer de véritables cartes fonctionnelles (Ideker et *al.*, 2001).

A.2.2 Etude du protéome

Le terme protéome est cité pour la première fois lors de la conférence de Sienne en 1994 sur l'électrophorèse bidimensionnelle. Il décrit l'ensemble des PROTEines exprimées par un génOME c'est-à-dire, l'ensemble des gènes exprimés en protéines dans un organisme donné, à un moment donné, et dans une situation donnée (Wilkins et *al.* 1995). L'année suivante (1996), est apparu le terme de protéomique qui représente l'analyse de l'état changeant du protéome et s'occupe de la dynamique qui gouverne les processus biologiques au niveau de la protéine.

Le but de cette approche holistique consiste à avoir une vision plus globale et donc plus juste du fonctionnement de la cellule (Godovac-Zimmermann et Brown, 2001). Cependant, une approche de type protéomique ne désigne aujourd'hui plus seulement des travaux visant à caractériser le protéome d'une cellule ou d'un tissu, mais plutôt une étude utilisant les outils de la protéomique (électrophorèse, chromatographie et spectrométrie de masse) dans le but de réaliser une analyse systématique des protéines contenues dans un échantillon plus ou moins complexe ; on parle ainsi d'approche protéomique pour des études qui visent à caractériser les protéines d'un compartiment subcellulaire, les constituants d'un complexe multi-protéique ou encore les acteurs protéiques d'une voie de signalisation (Garin et *al.*, 2001). Par ailleurs, la caractérisation de nouvelles protéines par une approche protéomique représente un moyen d'identifier de nouveau gènes, en particulier pour les organismes dont le génome n'a pas été séquencé et ceux pour lesquels les programmes automatiques de prédiction de séquences codantes sont peu fiables. En cela, la protéomique constitue un puissant outil pour l'annotation des génomes (Mann et Pandey, 2001). De plus, il a été montré que la corrélation entre la quantité de transcrits et la quantité de protéines n'est pas toujours positive (Gygi et *al.*, 1999 ; Gion et *al.*, 2005). L'analyse protéomique permet de

prendre en compte les modifications post-traductionnelles (Rabilloud et *al.*, 2001 ; Sperling, 2001).

A.2.2.1 Principales étapes de l'analyse protéomique

L'analyse protéomique se décompose en plusieurs étapes. La première est une étape de séparation des protéines, permettant d'obtenir des polypeptides individualisés. Cette séparation peut être effectuée avec des techniques telles que l'électrophorèse capillaire et sur gel ou la chromatographie liquide (Vestal, 1990 ; Link et *al.*, 1999). Actuellement la technique la plus utilisée reste l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2-D PAGE) (O'Farrell, 1975 ; Wilkins, 1997). La seconde est une étape de caractérisation permettant d'identifier les polypeptides d'intérêt. Les protéines sont repérées sur le gel à l'aide d'une coloration appropriée avant d'être analysées par microséquençage ou par spectrométrie de masse. L'identification des protéines a longtemps été réalisée par le biais du microséquençage chimique (chimie récurrente d'Edman). Aujourd'hui, cette approche a été remplacée par les techniques de spectrométrie de masse, (techniques beaucoup plus sensibles et environ 10^4 fois plus rapides que le micro-séquençage selon Edman), qui ont littéralement révolutionné la microanalyse des protéines. Dans une dernière étape, les données obtenues (carte peptidique massique, microséquences) sont comparées (BLAST) aux informations de séquences protéiques ou nucléiques des bases de données pour identification de la protéine.

D'autres approches ne necessitant pas la séparation préalable des protéines ont recemment été développées (voir A 2.2.2).

Electrophorèse bidimensionnelle

La technique la plus utilisée pour séparer et quantifier les protéines dénaturées est l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2-DE) (O'Farrell, 1975). Cette technique est capable de séparer simultanément des milliers de protéines (Klose, 1995 ; Görg et *al.*, 2000) suivant leur point isoélectrique et leur masse moléculaire.

C'est une méthode de séparation quantitative qui permet de déterminer les concentrations relatives des protéines exprimées. La précision des mesures dépend de la méthode de mise en image. Des développements techniques (Pandey et Mann, 2000) ont récemment été effectués pour augmenter la séparation et accroître la reproductibilité. Les gels

de première dimension font intervenir des gradients de pH immobilisés (IPG strips) allant d'un pH de 3 à 12 (Görg et *al.*, 1997). Ce système permet d'étudier des protéines comprises dans des gammes de pH précises afin d'accroître leur séparation, tout en augmentant la reproductibilité. Le chargement sur toute la longueur du gel rend possible la séparation de grandes quantités de protéines, de l'ordre du milligramme (Hanash et *al.*, 1991 ; Bjellqvist et *al.*, 1993), facilitant ainsi la caractérisation ultérieure des protéines.

Révélation des protéines

Les colorations des protéines en gel 2-DE reposent principalement sur l'emploi de colorants organiques tel que le bleu de Coomassie, de métaux tels que le nitrate d'argent, ou encore par des sondes fluorescentes. Ces méthodes diffèrent dans leur seuil de sensibilité et dans les difficultés de mise en œuvre. La gamme de détection varie d'un facteur d'environ 10000 entre les méthodes utilisant le bleu de Coomassie (détection de spots contenant une quantité de protéine de l'ordre du µg) et celles utilisant le nitrate d'argent qui permettent d'atteindre 0,1 ng. En revanche, la coloration à l'argent présente néanmoins certains inconvénients : la stoechiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode (Rabilloud, 2001). Plus récemment, la détection des spots par fluorescence (Sypro Orange, Sypro Red, Sypro Ruby) a été développée, avec une sensibilité et une linéarité d'intensité de coloration équivalente à celle de l'argent mais avec une reproductibilité, une facilité et une rapidité meilleures que celle de la coloration au nitrate d'argent (Rabilloud et Charmont, 2000).

La méthode de coloration la plus utilisée en protéomique est la coloration au bleu de Coomassie en raison de sa compatibilité avec la spectrométrie de masse. En effet, bien que des protocoles de coloration au nitrate d'argent compatibles avec la spectrométrie de masse aient été mis au point (Rabilloud et *al.*, 1998 ; Yan et *al.*, 2000 ; Mortez et *al.*, 2001), la coloration au bleu de Coomassie donne souvent de meilleurs résultats.

Analyse informatisée des gels 2D

Depuis les années 1970, la méthode d'analyse des gels a évolué grâce aux progrès combinés de l'informatique et de l'analyse d'image. La première étape de l'analyse est la

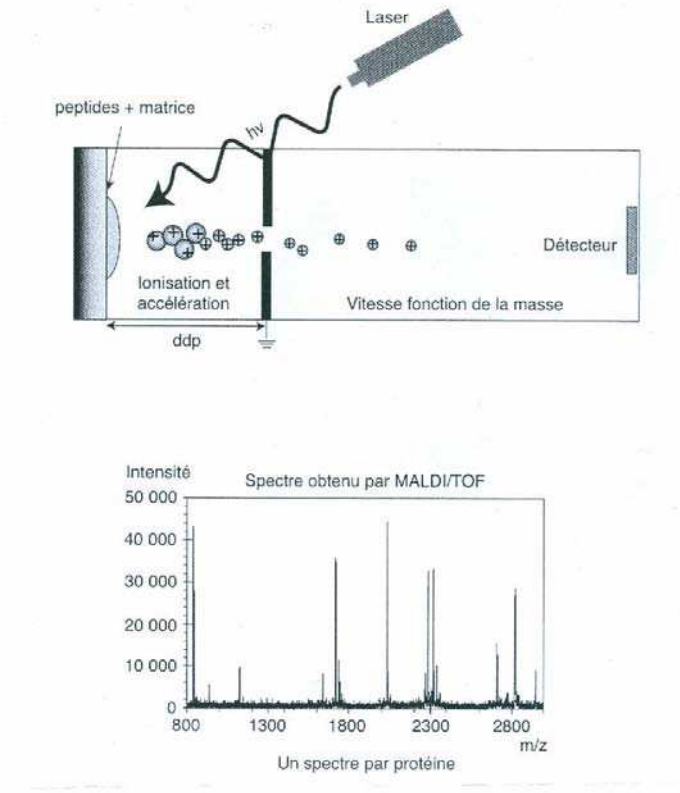


Figure 6: Fonctionnement de la MS MALDI-TOF (Zivy et al., 2004)

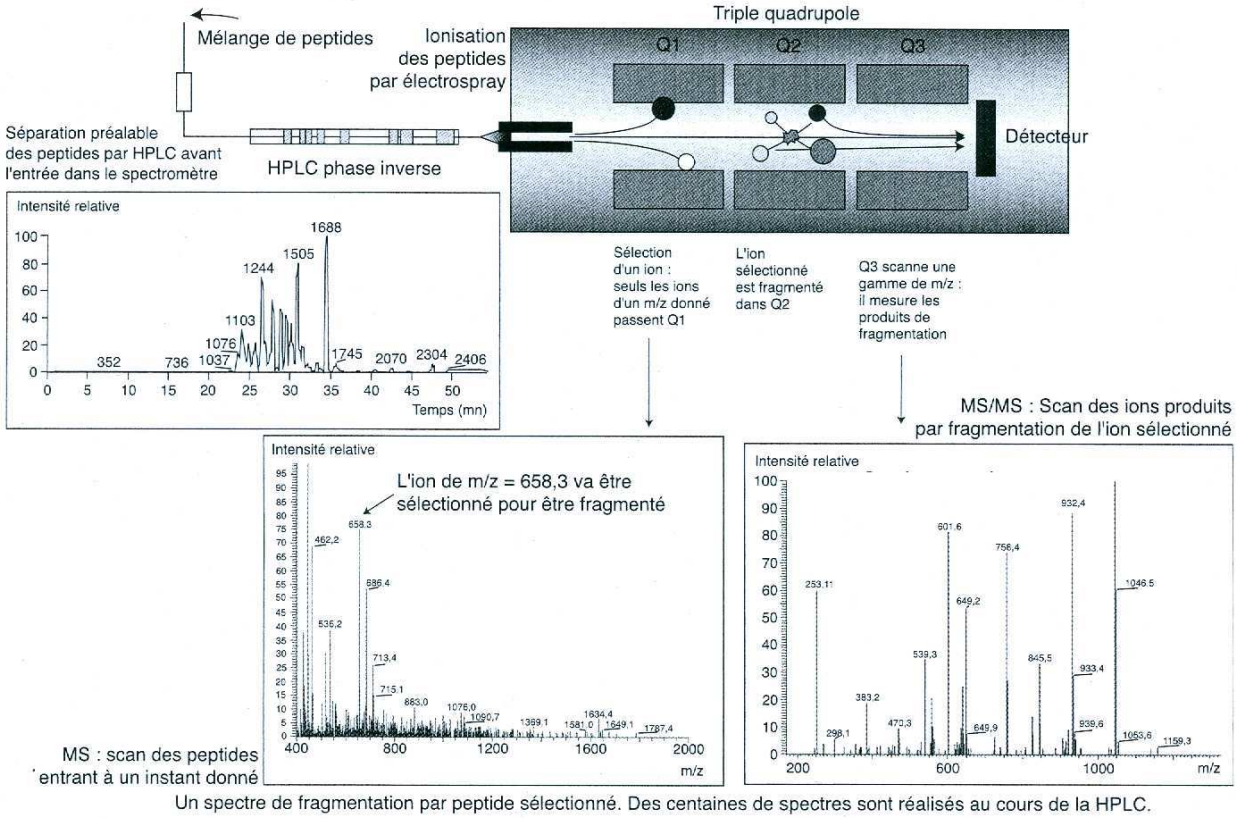


Figure 7: Fonctionnement du couplage LC-MS/MS (Zivy et al., 2004)

digitalisation des gels, c'est-à-dire la transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par l'ordinateur. Plusieurs types d'appareils permettent de réaliser cette acquisition d'image : scanners, caméras, densitomètres lasers, phospho- ou fluoro-imageurs. Dans un second temps, les images obtenues sont quantifiées. Pour cela, divers logiciels [Mélanie, Progenesis, PDQuest, Z3 et Z4000, et Phoretix (Rosengren et *al.*, 2003 ; Marengo et *al.*, 2005)] qui permettent d'éliminer le bruit de fond, les artéfacts de migration et de comparer l'intensité des spots ont été développés (Appel et *al.*, 1997). La détection des protéines présentes dans un gel 2D fournit certaines informations, mais les données pertinentes sont issues le plus souvent de la comparaison de gels provenant de différentes situations expérimentales. Toute la difficulté repose donc sur la capacité de comparer les spots d'un gel à l'autre. Durant ces dernières années, des progrès considérables apportés sur les logiciels d'analyse d'image et sur la reproductibilité des gels 2D ont facilité ce processus de comparaison et ont rendu beaucoup plus fiable l'analyse quantitative de l'expression des protéines (Rosengren et *al.*, 2003).

Identification des protéines présentes dans les gels 2D : analyse de spectrométrie de masse

L'avancée majeure en termes de possibilité d'identification des protéines de gels 2D date de 1993-1994 et correspond à l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des bases de données. En s'adaptant à la biologie structurale, la spectrométrie de masse a permis de réduire considérablement les quantités de protéines nécessaires à l'identification (Matsuo et Seyama, 2000). Cette technique permet de déterminer avec une sensibilité et une précision extrême la masse des molécules. Un spectromètre de masse se compose d'une source où s'effectue l'ionisation et la désorption des ions, d'un analyseur où les ions sont séparés en fonction de leur rapport "masse sur charge" (m/z) et d'un détecteur permettant l'enregistrement et la quantification des ions (Figure 6).

Pour l'étude des composés peptidiques, deux modes d'ionisation sont principalement utilisés : la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) qui permet de réaliser une empreinte peptidique après digestion protéolytique (Figure 6) et la spectrométrie de masse en tandem en mode nanospray (MS/MS) qui permet d'obtenir une microséquence en acides aminés (Figure 7). Dans une première étape les protéines séparées par électrophorèse 2D sont digérées soit directement dans le gel, soit après transfert sur une membrane, par un enzyme ou un composé chimique qui coupe spécifiquement après certains acides aminés. La

trypsine, qui agit en C-terminal d'un résidu lysine ou arginine, est la plus souvent utilisée. Les masses des peptides obtenus après digestion de la protéine sont mesurées par MALDI-TOF et l'ensemble de ces masses constitue l'empreinte peptidique de la protéine. Cette empreinte peptidique est comparée aux empreintes peptidiques théoriques déduites de chacune des séquences présentes dans les banques de données protéiques (en effectuant une digestion *in silico* de chacune de ces protéines par la trypsine). L'identification de la protéine est fondée sur la reconnaissance d'un nombre maximal de peptides issus de l'empreinte peptidique de la protéine à identifier.

Lorsque plusieurs candidats sont proposés, les données du spectre MALDI-TOF peuvent alors être enrichies par les paramètres physico-chimiques de la protéine (Mr et pI) déterminés par l'électrophorèse 2D.

Une étude plus fine mais plus complexe et plus coûteuse peut être réalisée en utilisant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans ce cas après une première analyse du spectre de masse, les peptides sont analysés une deuxième fois pour générer des informations sur la séquence d'acides aminés, à condition de trouver une homologie entre le spectre des masses issues du peptide et les masses de différents acides aminés obtenues *in silico* (Lahm et Langen, 2000 ; Patterson, 2000).

Le véritable défi de la spectrométrie de masse repose désormais sur l'élaboration de programmes bioinformatique plus efficaces pour tirer partie au mieux des informations déduites des spectres de masse, et permettre une identification rapide et statistiquement fiable à partir du contenu de diverses banques de données.

A.2.2.2 Nouvelles approches méthodologiques et technologiques

Une difficulté de l'analyse protéomique vient des différences de solubilité des protéines du fait de leur hétérogénéité chimique. Ce problème de solubilité biaise la représentation des protéines faiblement solubles dans les cartes d'électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines membranaires sont très difficilement analysables par les techniques classiques d'électrophorèse bidimensionnelle (Adessi et *al.*, 1997 ; Chevallet et *al.*, 1998 ; Wilkins et *al.*, 1998), en particulier les protéines hydrophobes, qui ont fortement tendance à précipiter lors de l'étape d'électrofocalisation. Ainsi, les techniques disponibles ne

conduisent en effet qu'à identifier des protéines membranaires périphériques (Santoni et *al.*, 1998 ; Peltier et *al.*, 2000 ; Rossignol, 2001).

Une autre limite est liée à la dynamique de l'expression des protéines dans la cellule (Wilkins et *al.*, 1998). En effet, les protéines faiblement exprimées dans la cellule sont présentes à des taux de l'ordre de 50 à 100 molécules par cellule, alors que les protéines fortement exprimées sont présentes à des taux de l'ordre de 10^7 molécules par cellule. Seules les protéines les plus abondantes peuvent être analysées par les techniques classiques d'électrophorèse bidimensionnelle. Gygi et *al.* (1999), ont développé la methode « ICAT » (*Isotope Coded Affinity Tag*). ICAT est une molécule formée de trois parties : une biotine, un « linker », et un réactif spécifique des thiols. Elle est fabriquée sous deux formes qui diffèrent par le remplacement ou non de 8 atomes d'hydrogène du linker par 8 atomes de deutérium. Pour comparer deux échantillons, l'un est marqué par la forme légère et l'autre par la forme lourde, ICAT se fixant sur les cystéines. Les échantillons sont mélangés et à la suite d'une digestion trypsique, seuls les peptides contenant une cystéine sont retenus par affinité grâce à la biotine. Ceux-ci sont ensuite comparés par LC-MS. Les couples de peptides séparés par 8 unités de masse sont repérés et quantifiés puis identifiés par MS/MS. Cette méthode est effectivement quantitative car les peptides sont quantifiés dans le même spectre et les deux formes d'ICAT ne modifient pas l'ionisation des peptides. En ne selectionnant que les peptides contenant une cystéine, acide aminé rare, le mélange de peptides à analyser par LC-MS est simplifié. Il faut cependant noter que c'est aussi une entrave à l'identification des protéines : les peptides ne pourront pas être correctement séparés avant leur entrée dans le spectromètre de masse (pouvoir séparatif des nanocolonnes). De plus, de nombreuses pertes de peptides sont observées (adsorption des peptides sur les différentes colonnes). De ce fait, la perte d'un peptide peut signifier la perte de la protéine correspondante. Lors de la séparation chromatographique, les paires de peptides lourds et légers ne sont pas co-éluées car ils ont des temps de retentions différents, empêchant toute analyse quantitative. Enfin la quantification est limitée à la comparaison d'un échantillon contre un autre. Elle a cependant suscité un très large intérêt et conduit au développement de méthodologies alternatives moins coûteuses. Des méthodes basées sur le marquage des protéines par des isotopes stables ont été développées pour quantifier les variations de quantité de protéines (Ong et *al.*, 2002 ; Washburn et *al.*, 2002) ou le taux de phosphorylation entre deux échantillons (Oda et *al.*, 1999). D'importants développements sont réalisés dans le domaine de la HPLC avec en particulier l'utilisation de 2D-LC, c'est-à-dire l'utilisation en ligne de deux HPLC à critères de séparation différents

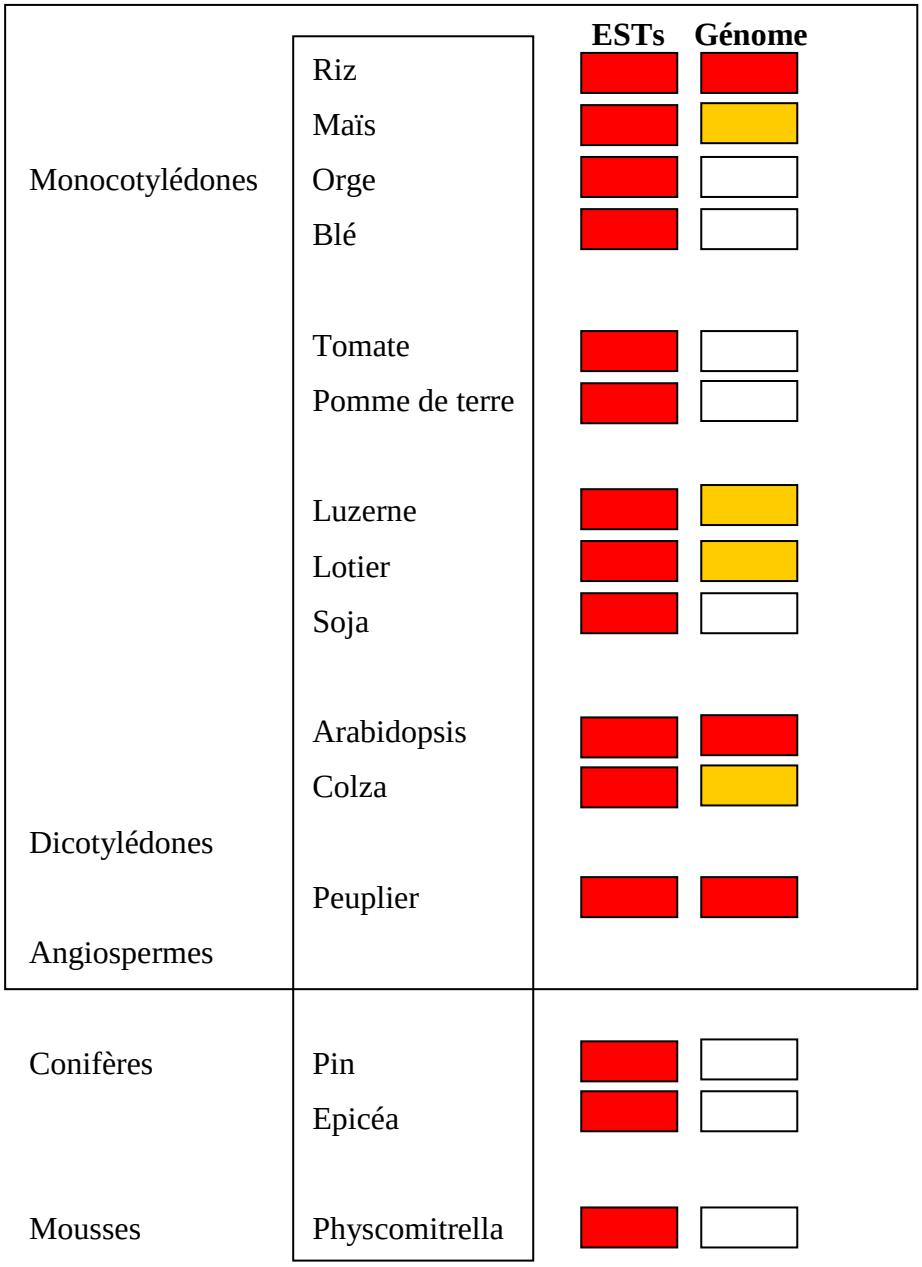


Figure 8: Plusieurs programmes de séquençage de génomes nucléaires et de fragments de gènes exprimés (ESTs) sont en cours chez les plantes. En rouge : programmes terminés ou en phase finale ; en jaune, programmes en cours. Une liste complète, mise à jour régulièrement est disponible sur le site du NCBI/GenBank : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/plantList.html. (Martin et Kohler, 2004).

pour mieux séparer les peptides avant l'entrée dans le spectromètre. Ainsi Wolters et *al.* (2001) ont développé une méthode appelée MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), où, après digestion enzymatique (sans séparation électrophorétique préalable des protéines), les peptides subissent une séparation sur colonne comprenant deux compartiments correspondant à une colonne échangeuse d'ions et une colonne en phase inverse. Près de 1500 protéines ont ainsi pu être identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Washburn et *al.*, 2002), et près de 2400 chez le riz, en utilisant les séquences génomiques connues (Koller et *al.*, 2002).

L'analyse des interactions protéine-protéine est également un domaine en pleine extension. Des méthodes très diverses sont mises en œuvre pour isoler et purifier des complexes protéiques. Elles vont de la technique dite du « *blue native* » (Brookes et *al.*, 2002 ; Nijtmans et *al.*, 2002) à des techniques basées sur des constructions où la protéine dont on veut connaître les partenaires est fusionnée avec un ou des peptides permettant de la purifier par affinité , avec ses partenaires (Rigaut et al., 1999 ; Gavin et *al.*, 2002 ; Ho et *al.*, 2002). Shevchenko et *al.* (2002) ont comparé les résultats obtenus par ce type d'analyse avec ceux obtenus à l'aide du criblage par double hybride. Les deux méthodes donnent des résultats assez différents, avec seulement 14% de recoupement.

Des puces à protéines de différents types également développées ont déjà permis de mettre en évidence des interactions protéine/protéine ou avec d'autres molécules (Schweitzer et Kingsmore, 2002 ; Zhu et *al.*, 2001).

Ainsi, la spectrométrie de masse est un domaine en plein développement, et chaque année apparaissent de nouveaux appareils alliant les capacités haut débit de telle technologie avec la précision de telle autre ou encore la sensibilité d'une troisième.

A.2.2.3 Analyse protéomique chez les plantes

Les travaux utilisant l'approche protéomique se sont multipliés chez les plantes grâce à la disponibilité des séquences génomiques complètes notamment d'*Arabidopsis*, du riz et du peuplier (figure 8).

Les analyses protéomiques restent encore très marginales chez les végétaux en particulier chez les ligneux. Seuls des travaux récents sur le peuplier (Plomion et *al.*, 2006 ; Bohler et *al.*, 2007), le pin maritime (Gion et *al.*, 2005), et l'eucalyptus (Fiorani Celedon et *al.*, 2007) présentent des gels où le nombre de spots détectés est limité. Il existe deux freins majeurs à ce type d'étude chez les ligneux : (i) une quantité importante de polysaccharides qui s'agrègent avec les protéines et interfèrent pendant la migration, (ii) les pigments et les composés phénoliques présents en grande quantité dans les tissus des plantes ligneuses peuvent causer des traînées et produire des artefacts (Hari, 1981 ; Mihr et Braun, 2003).

Ces trois dernières années, une centaine d'articles originaux qui portent sur le protéome d'au moins 26 espèces ont été publiés seulement une ou deux références bibliographiques sont disponibles par espèce alors qu'on en trouve respectivement 28 et 11 pour *Arabidopsis thaliana* et le riz (Jorrin et *al.*, 2007). Pour les espèces différentes du riz et d'*Arabidopsis*, la quantité de séquences d'ADN génomique et d'EST publiées n'est pas suffisante, entravant le succès d'identification des protéines. A cet égard, il est important de préciser que le nombre d'entrées de plantes spécifiques aux bases de données UniProtKB/Swiss-Prot et TrEMBL pour février 2007, sont de 376647 et 289134, respectivement (Jorrin et *al.*, 2007), ce qui représente une augmentation significative par rapport à 2006 (Rossignol et *al.*, 2006). Jusqu'à présent, les travaux ont portés sur l'analyse protéomique des organes / tissus / suspension cellulaire ou fraction subcellulaire afin de mieux comprendre le développement des plantes, l'effet des hormones, les réponses des plantes aux stress et la mise en place de la symbiose. Un nombre restreint de contributions a traité des modifications post-traductionnelles (PTMs) et d'interactions protéiques (Jorrin et *al.*, 2007).

Partie 2 : Matériel et méthodes



(A) **(B)**

Figure 9 : Le matériel végétal en culture *in vitro* (A) et hydroponique (B).

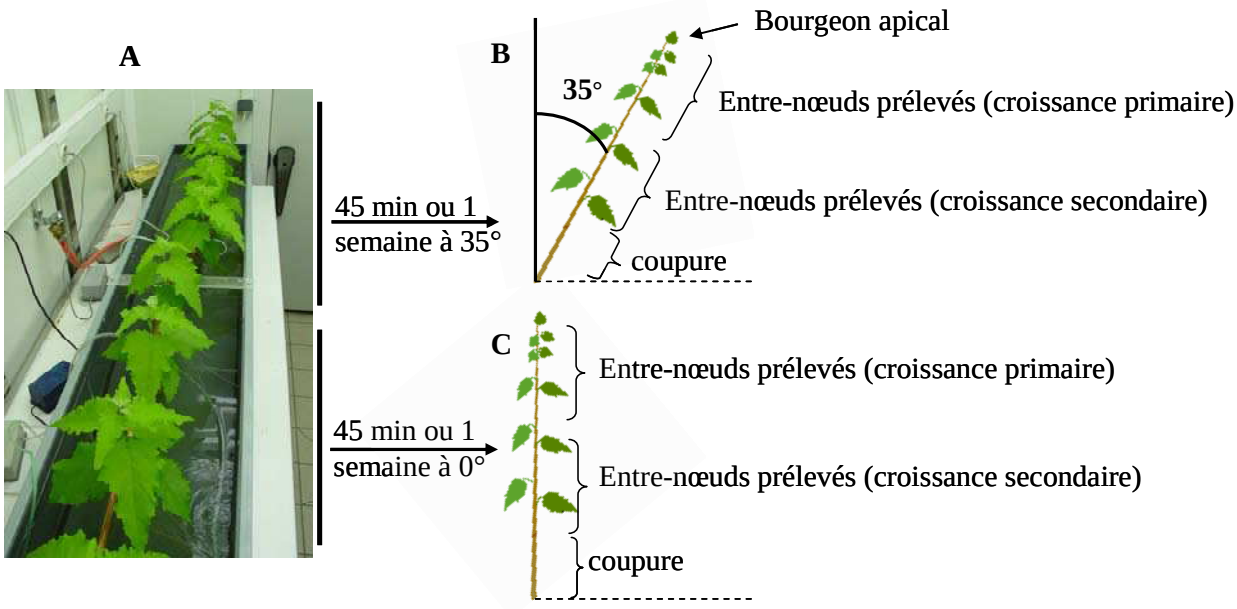


Figure 10: (A) Peupliers installés sur un dispositif qui permet de les incliner de manière contrôlée. (B) Peupliers inclinés 35° par rapport à l'axe vertical, les entre-nœuds 1 à 5 (bas de la tige) et 13 à 20 (haut de la tige) sont récoltés après 45 min ou 1 semaine d'inclinaison. (C) Peupliers témoins, les entre-nœuds 1 à 5 (bas de la tige) et 13 à 20 (haut de la tige) sont récoltés après 45 min ou 1 semaine.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel végétal

Ce travail a été réalisé sur le peuplier, clone femelle INRA N° 717-1-B4 (*Populus tremula x Populus alba*) fourni par le Dr. Gilles Pilate (INRA Orléans, France).

Ce matériel végétal est multiplié végétativement *in vitro* sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) (annexe 1). Après multiplication végétative, les micro-plants enracinés sont acclimatés en hydroponie (solution nutritive aérée) dans une atmosphère confinée, saturée en humidité. La composition de la solution nutritive est décrite en annexe 2. Après 5 jours en atmosphère saturée d'humidité, les couvercles sont progressivement ouverts au cours des 5 jours suivants.

Les peupliers sont maintenus en culture hydroponique (figure 9) jusqu'à ce qu'ils aient développé treize entre-nœuds, dans une chambre de culture avec une photopériode 16h/8h, une intensité lumineuse de 60 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$, 22°C jour/18°C nuit, et 70% d'humidité relative. Les peupliers sont alors transférés sur un nouveau dispositif qui permettra de les incliner de manière contrôlée (figure 10).

B. Application du stimulus gravitropique

Une semaine après avoir été transférés sur le dispositif décrit figure 10 (stade vingtaine d'entre-nœuds), les peupliers sont inclinés de 35° par rapport à l'axe vertical. Cet angle d'inclinaison a été choisi grâce à des études préalables réalisées par le Dr.B. Moulia (INRA Clermont-Ferrand, France). Une inclinaison plus importante conduit au développement de bourgeons axillaires plutôt qu'au redressement de la tige principale. Les durées d'inclinaison sont de 45 min ou d'une semaine. L'inclinaison est réalisée 1 h avant la fin de la nuit. Après l'inclinaison, les tiges sont coupées, effeuillées, les entre-nœuds 1 à 5 (bas de la tige) et 13 à 20 (haut de la tige) sont prélevés et congelés dans l'azote liquide à -80°C jusqu'au moment de l'extraction des ARN ou des protéines.

C. Observations anatomiques

Afin de vérifier la présence de bois de tension et des polysaccharides tels que l'amidon, des coupes anatomiques ont été réalisées au niveau des entre-nœuds inférieurs et supérieurs de la tige après 45 min et une semaine d'inclinaison.

C.1. Préparation des échantillons

C.1.1 Fixation, inclusion du matériel végétal dans la résine et coupes

La préparation des échantillons pour l'histologie consiste dans un premier temps à fixer le matériel végétal pour permettre une bonne conservation de la morphologie cellulaire puis dans un deuxième temps à imprégner les tissus par une résine capable de durcir et de donner un bloc à partir duquel on peut réaliser des coupes semi-fines d'environ 2 µm d'épaisseur grâce à un microtome.

Le matériel est d'abord fixé dans un mélange de formaldéhyde 3.7%, acide acétique 5%, éthanol 50% sous vide pendant 30 min puis fixé en présence de FAA neuf durant 5 à 6 h à 4°C. La déshydratation du matériel végétal est obtenue par des bains d'éthanol de concentration croissante à 4°C : éthanol 50%, 70%, 80%, 95%, (30 min), et 100% (30 min et une nuit). Le lendemain, la déshydratation est suivie par un échange du solvant de façon progressive : éthanol (100%) 2/3, résine 1/3 pendant 30 min puis dans un mélange éthanol 100% 1/2 : résine 1/2 pendant 30 min et enfin dans un mélange éthanol 100% 1/3 : résine 2/3 pendant 30 min. Le matériel est ensuite incubé dans la résine LR white pure pendant 1 h à 4°C. La résine est renouvelée et laissée pendant une nuit à 4°C pour une bonne imprégnation. Le troisième jour, le matériel est inclus dans des gélules dans lesquelles la résine est coulée, puis le tout est placé à 55°C pendant 24 h à 3 jours pour la polymérisation. Après polymérisation, des coupes sont réalisées avec un microtome (Reichert, Om U2) à l'aide de couteau de verre puis colorées.

C.1.2 Coloration safranine bleu-astra

La présence de bois de tension au niveau des coupes transversales est mise en évidence au moyen d'une double coloration à la safranine et au bleu-astra. La safranine colore

en rouge les parois cellulaires lignifiées, le bleu-astra colore en bleu la couche gélatineuse de nature purement cellulosique.

Les différentes coupes sont incubées dans un bain de javel 2.4 M pendant 6 min pour vider le contenu cellulaire. Après rinçage des coupes à l'eau, celles-ci sont déposées dans des solutions au pourcentage d'éthanol croissant (25% à 70%) pendant 5 min pour les déshydrater. Elles sont ensuite placées successivement dans une solution de safranine à 1% dans de l'alcool à 70% pendant 3 min et dans une solution de bleu-astra à 1% dans l'éthanol 100% pendant 3 min avec un rinçage dans l'éthanol 100% entre les 2 étapes. Enfin, elles sont séchées et montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (Euromedex, Mündelsheim, France). Les coupes sont observées sous microscope (Axioplan 2, Zeiss).

C.1.3 Coloration PAS

La présence des polysaccharides tel que l'amidon au niveau des coupes transversales et longitudinales est mise en évidence par la réaction à l'acide périodique-Schiff (PAS). A température ambiante, l'acide périodique oxyde les groupements glycols (CHOH-CHOH) des polysaccharides, les groupements aldéhydes ainsi libérés sont révélés par le réactif de Schiff (Locquin et Langeron, 1978). Cette technique de coloration permet ainsi de colorer l'amidon mais aussi la cellulose, l'hémicellulose et les composées pectiques, permettant ainsi de visualiser le contour des cellules sans avoir besoin de faire une double coloration.

Les coupes sont d'abord incubées dans l'acide périodique 1% pendant 5 à 10 min. Un rinçage dans l'eau distillée pendant 4 min est ensuite effectué, puis les coupes sont incubées dans le réactif de Schiff à l'obscurité pendant 15 min, et enfin les coupes sont rincées dans du métabisulfite de Na 1% ($Na_2O_5S_2$) pendant 4 min puis dans l'eau. Les coupes sont alors séchées et montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (Euromedex, Mündelsheim, France) et observées sous microscope (Axioplan 2, Zeiss).

C.1.4 Coloration au bleu de toluidine

Le bleu de toluidine colore toutes les structures basophiles avec une intensité qui varie selon leur richesse en acides nucléiques et métachromosomique avec certaines glycoprotéines riches en eau. Ce colorant permet ainsi une coloration rose à rose pâle des cellules à paroi

pecto-cellulosique (par exemple : épiderme, parenchyme, phloème, liber), une coloration bleue des parois lignifiées (par exemple : sclérenchyme, fibres, bois…), coloration violacée des parois subérifiées (par exemple : suber) et une coloration bleu foncée des parois ayant des acides gras à longue chaîne (par exemple : cuticule des épidermes).

Les coupes sont incubées dans une solution de bleu de toluidine à 0.25% (p/v) pendant 5 min, puis rincées dans l'eau distillée. Les coupes sont alors séchées et montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (Euromedex, Mündelsheim, France) et observées sous microscope (Axioplan 2, Zeiss).

D. Puces à ADN

D.1 Extraction des ARN totaux

L'échantillon est réduit en poudre à sec et au froid (azote liquide). Les ARN totaux ont été extraits à partir d'environ 200 mg de poudre à l'aide du tampon d'extraction CTAB selon le protocole de Chang et *al.* (1993) (annexe 3). Les extraits ont ensuite été quantifiés par spectrophotométrie NanoDrop v 3.3 (ND-1000 Wilmington, DE, USA). La qualité des ARN a été vérifiée par la valeur du rapport de DO_{260}/DO_{280} qui était comprise entre 1.8 et 2 et par migration sur gel d'agarose à 1.2%.

D.2 Le plan d'expérience

L'expérience a pour objectif l'identification des gènes qui s'expriment de manière différentielle entre peuplier droit et peuplier incliné.

Deux plantes individuelles témoins et deux plantes individuelles inclinées de 35° par rapport à l'axe vertical sont utilisées pour l'expérience. L'expérience a été réalisée sur des entre nœuds supérieurs et inférieurs et pour la condition d'inclinaison de 45 min.

Nous avons utilisée deux plantes pour chaque condition (témoin et incliné), ce qui va permettre de prendre en compte la variabilité biologique dans le traitement des données.

Le plan d'expérience comportait 2 séries de manip. Pour chaque série, un peuplier incliné et un peuplier non incliné ont été utilisés. Au totale 8 cibles sont préparées et analysées. Chaque expérience est une répétition biologique.

Expérience 1

ARN cibles

pb1 : peuplier penché, prélèvement bas

ph1 : peuplier penché, prélèvement haut

tb1 : peupier témoin, prélèvement bas

th1 : peuplier témoin, prélèvement haut

Expérience 2

ARN cibles

pb2 : peuplier penché, prélèvement bas

ph2 : peuplier penché, prélèvement haut

tb2 : peupier témoin, prélèvement bas

th2 : peuplier témoin, prélèvement haut

On distingue les répétitions techniques des répétitions biologiques. Les répétitions techniques ont consisté à réaliser 2 lames avec les mêmes échantillons en échangeant le fluorochrome utilisé pour chaque traitement, c'est ce qu'on appelle « dye-swap ».

	Lames	**Combinaison des cibles pour hybridation**
Dye-swap 1	13040225	pb1 **Cy5**, tb1 **Cy3**
	13040224	pb1 **Cy3**, tb1 **Cy5**
Dye-swap 2	13059810	pb2 **Cy5**, tb2 **Cy3**
	13059809	pb2 **Cy3**, tb2 **Cy5**
Dye-swap 3	13042427	ph1 **Cy5**, th1 **Cy3**
	13040227	ph1 **Cy3**, th1 **Cy5**
Dye-sawp 4	13059804	ph2 **Cy5**, th2 **Cy3**
	13059811	ph2 **Cy3**, th2 **Cy5**

Le dispositif en « dye-swap » a pour objectif de corriger les biais de marquage des ADNc par les fluorochromes. Elles permettent d'évaluer l'erreur expérimentale (Kerr, 2003). Le déséquilibre de marquage entre les deux fluorochromes peut être systématique ou spécifique à certains gènes. Le « dye-swap » est en fait un dispositif en carré latin (une seule occurrence pour chaque type de marquage par ligne et par colonne), c'est-à-dire que l'on va faire une répétition technique en inversant les marquages, chaque traitement étant ainsi marqué par les deux fluorochromes. L'effet du marquage est ainsi confondu avec l'effet d'interaction lame x traitement.

Ce dispositif est vivement recommandé car le biais de marquage spécifique à certains gènes ne peut pas être supprimé lors de la normalisation des données

D.3 Dépôt des sondes

Les sondes sont des séquences d'ADN caractéristiques des gènes dont on cherche à déterminer le niveau de transcription. Ces sondes correspondent à un produit d'amplification par PCR d'inserts à partir de banques d'ADNc (banques EST). Les sondes sont déposées grâce à un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre. La taille de chaque spot est de l'ordre de 100 µm.

Un gène peut être déposé plusieurs fois sur la lame (deux fois dans notre cas), et correspond donc à plusieurs spots. Chaque spot est identifié de manière unique sur la lame par ses numéros de bloc, de colonne et de ligne. Le dépôt des sondes sur la lame se fait par blocs. Dans notre cas, les spots sont répartis en 48 blocs correspondant aux 48 aiguilles du robot. Chaque bloc est constitué de (25 lignes × 25 colonnes). De plus, chaque gène est déposé deux fois sur la lame sur deux spots adjacents. Cependant, lorsque le premier spot d'un gène est déposé en colonne 25, le second sera déposé sur la première colonne de la ligne suivante.
Les lames comportent aussi certains spots vides, c'est-à-dire des spots où aucune sonde n'est déposée.

Les sondes des lames que nous utilisons proviennent des quatre banques d'EST réalisées par l'équipe d'Orléans (Déjardin et *al.*, 2004). Chaque lame compte environ 15 000 séquences en duplicats.

- La banque PtaC, correspond à la zone cambiale (ou cambium) dans le bois opposé et dans le bois tendu.

- La banque PtaJXO, correspond à du jeune xylème dans le bois opposé.
- La banque PtaJXT, correspond à du jeune xylème dans le bois tendu.
- La banque PtaXM, correspond à du xylème mature dans le bois opposé et tendu.

D.4 Amplification d'ARN pour hybridation sur microarray

L'amplification des ARN et l'incorporation des fluorophores cyanine Cy3 (vert) et cyanine Cy5 (rouge) sont réalisées à l'aide du Kit Amino Allyl Message-Amp II aRNA Ambion, ref 1753) qui a été déjà utilisé et validé par Lafarguette et *al.* (2004), suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN totaux sont rétrotranscrits : un µg d'ARN total est incubé avec 1µl de T7 Oligo(dT) à 70°C pendant 10 min puis placé sur de la glace et la synthèse du premier brin est réalisée en présence de 2 µl du tampon premier brin 10X, 4µl de dNTP mix, 1 µl d'inhibiteur de RNase et 1 µl de ArrayScript par échantillon. La solution est incubée à 42°C pendant 2 h. Pour la synthèse du second brin, sont rajoutés : 10 µl du tampon second brin, 4 µl dNTP mix, 2 µl DNA polymerase, 1 µl RNase H et63 µl H_2O nuclease-free par échantillon. La solution est incubée 2 h à 16°C puis placée sur de la glace. Les ADNc double brin synthétisés sont purifiés suivant les instructions du Kit Amino Allyl Message-Amp II aRNA (annexe 4). La transcription *in vitro* pour chaque échantillon est réalisée dans une solution contenant: 3 µl UTP (50 mM), 12 µl ATP, CTP, GTP mix (25 mM), 3 µl UTP (50 mM), 4 µl de tampon de réaction 10X, et 4 µl de mix d'enzyme contenant la T7 polymerase. La solution est incubée à 37°C pendant 16h et la réaction est arrêtée avec 60 µl de H_2O nuclease free. Les ARN amplifiés sont ensuite purifiés suivant les instructions du Kit Amino Allyl Message-Amp II aRNA (annexe 4) et quantifié à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop v 3.3 (ND-1000 Wilmington, DE, USA).

D.5 Marquage des cibles

Le couplage des nucléotides s'effectue avec des cyanines Cy3 et Cy5 préparées selon les recommandations du fournisseur (kit CyDye Post labelling reactive Dye, ref RPN 5661, Amersham).

Dix µg d'ARN amplifiés séchés sont incubés avec 11 µl de Cy3 ou Cy5, 30 min à température ambiante et à l'obscurité. 4.5 µl d'hydroxylamine 4 M sont ensuite ajoutés (incubation 15 min à température ambiante et à l'obscurité) puis 5.5 µl de H_2O nuclease free pour amener le volume de la réaction à 30 µl. Les ARN marqués sont ensuite purifiés suivant

les instructions du Kit Amino Allyl Message-Amp II aRNA (annexe 4) et quantifiés au spectrophotomètre NanoDrop v 3.3 (ND-1000 Wilmington, DE USA). Le taux d'incorporation des cyanines est évalué en mesurant la DO à 550 et 650 nm respectivement pour Cy3 et Cy5 et permet de calculer la quantité d'ARN amplifiés marqués.

D.6 Hybridation sur lame de microarray, lavages et acquisition de l'image

D.6.1 Hybridation sur lame de microarray et lavages

Les ARN marqués avec les fluorophores (Cy3 et Cy5) sont dénaturés 1 min à 95°C et rassemblés dans un volume de 60 µl de tampon d'hybridation (formamide 25%, SSC 5x, SDS 0.1%). Les ARN sont ensuite chauffés 2 min à 65°C. L'échantillon est déposé par goutte sur le côté spotté de la lame puis est recouvert d'une lamelle, de manière à le mettre en contact avec l'ensemble de la surface de la lame. Celle-ci est ensuite placée dans une chambre d'hybridation qui est incubée dans un bain-marie à 42°C pendant 18 h à l'abri de la lumière.

Après hybridation, les lames sont lavées en tube Falcon dans trois tampons successifs à 55°C dans un four à hybridation sous agitation (6 tours/minute).

- 10 min avec une solution SSC 1x, SDS 0.2%
- 10 min avec une solution SSC 0.1x, SDS 0.2%
- 10 min avec une solution SSC 0.1x

Un dernier rinçage rapide en H_2O est effectué avant le séchage des lames par centrifugation 10 sec à 800 rpm (microcentrifuge labnet).

D.6.2 Acquisition de l'image et des données

L'acquisition des données se fait par la lecture des lames par un scanner Genepix 4000B (Axon Instrument Inc., Molecular Devices Corporation, Union City, CA, USA) qui permet de mesurer la fluorescence de chaque spot. Ce scanner est constitué de deux lasers qui vont capter les fluorescences verte et rouge. Le scanner génère deux images, une pour chaque fluorochrome, puis les superpose pour représenter le différentiel d'expression. La couleur d'un spot peut donc varier du vert (si le gène correspondant n'est présent que dans le transcriptome marqué avec la Cy3) au rouge (inversement avec la Cy5), en passant par le jaune lorsque les deux transcriptomes se sont hybridés de manière égale.

L'analyse de l'image se fait en quatre étapes :

- Localisation des spots sur la puce.
- Segmentation des spots, qui permet de discriminer, pour chaque spot, les pixels «signal» des pixels « bruit de fond ».
- L'extraction des données, qui consiste à définir, pour chaque spot, des paires d'intensité du signal Cy3 et Cy5.
- Vérification de la qualité des spots.

La localisation des spots se fait en utilisant un masque, c'est-à-dire une grille théorique définie en fonction du plan de dépôt. Ce masque est placé sur l'image pour repérer chacun des spots. La segmentation permet d'identifier chaque pixel « bruit de fond » ou «signal ». Le bruit de fond n'est jamais uniforme sur la lame, il est donc évalué pour chaque spot.

L'extraction des données permet d'obtenir une ou plusieurs valeurs par spot qui vont représenter le niveau d'expression du gène correspondant. Par exemple, on peut prendre en compte l'intensité totale du signal, l'intensité moyenne, l'intensité médiane, le volume de l'intensité, le ratio entre les intensités rouges et vertes.
Enfin, la qualité des spots est estimée grâce à des indexes représentant la régularité de la forme, l'uniformité du spot, son emplacement réel par rapport à l'emplacement attendu.

Une fois l'image acquise par le scanner, des spots peuvent être jugés « mauvais » soit par l'expérimentateur, soit par le logiciel d'analyse Genepix Pro 5.0 (http://www.axon.com/gn_GenePixSoftware.html). C'est le cas par exemple lorsque le bruit de fond est trop important (spot à coté d'une tache). Ainsi, il y aura certaines données manquantes au moment de l'analyse des données. Le logiciel permet de repérer visuellement les spots non exploitable (zone de la lame couvertes de bruit de fond, spot absent…) par un système de balisage « flags » qui assigne un code numérique selon la qualité du spot considéré, afin de faciliter le filtrage des données non significatives (dans Genepix Pro ; 0 correspond par défaut à un spot exploitable, -100 à un spot défini « mauvais », -75 à un spot défini « Absent », et -50 à un spot non détecté par le logiciel). Nous choisissons en général d'éliminer de l'analyse :

- les spots « mauvais » (flags = -100)
- les spots les trop proches du bruit de fond (SNR635 ou SNR532 > 3)
- les spots dont la saturation de F635 ou F532 ≥ 2

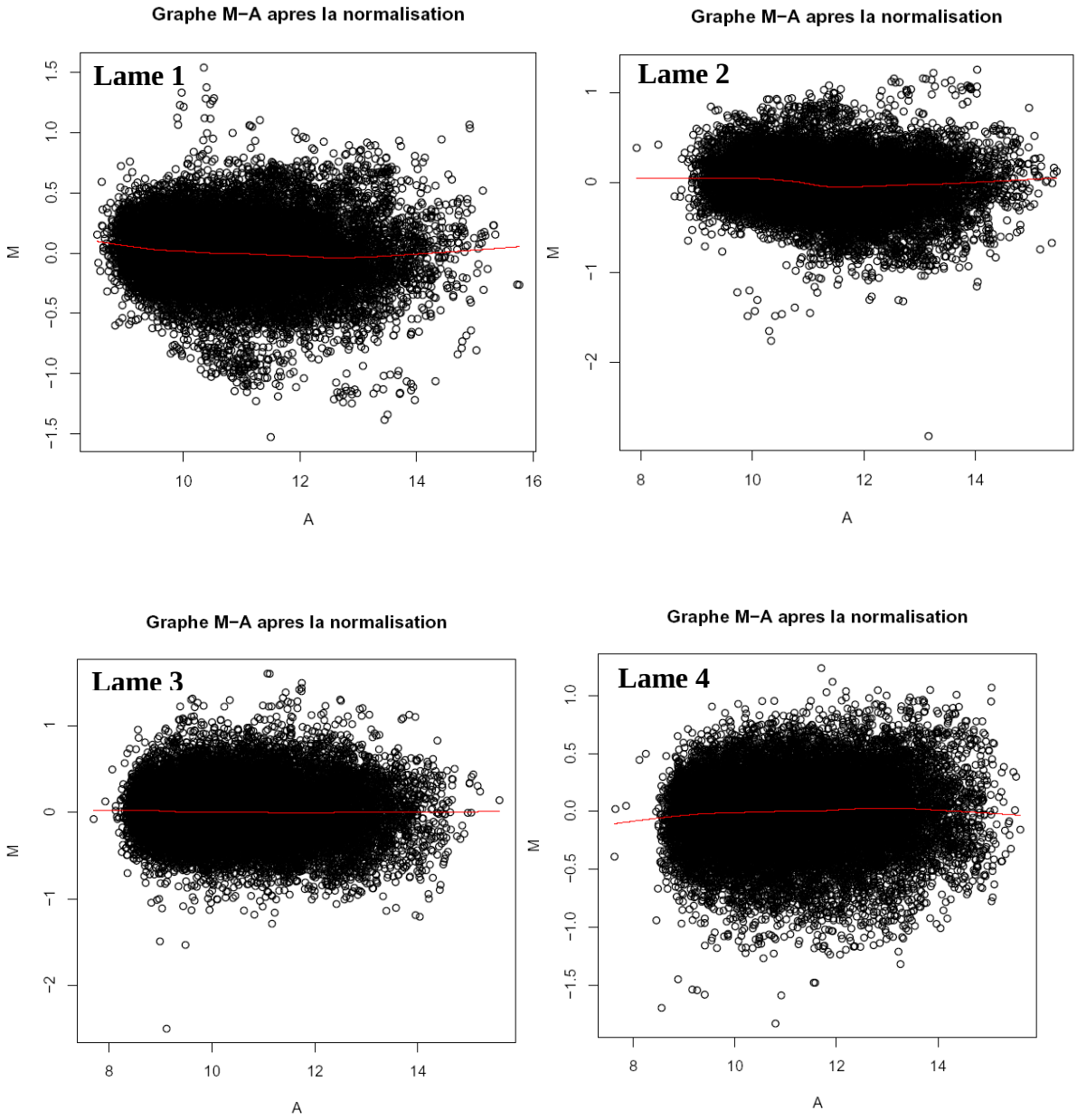


Figure 11 : Graphes M-A des données après normalisation lowess pour les 4 lames de l'arbre 1, Swap1 (lame 1 et lame 2) et l'arbre 2, Swap2 (lame 3 et lame 4). Le logratio moyen M = $\log_2$ (R/V) est représenté en ordonnée en fonction de l'intensité moyenne A = $\log_2$ (RV)/2 en abscisse. La courbe rouge est issue de la régression lowess de M sur A.

D.7 La normalisation « de Lowess »

La méthode de normalisation utilisée ici est une des plus employées. Elle a été mise au point par Yang *et* al. (2002). Les fluorochromes Cy3 et Cy5 n'ont pas la même efficacité d'incorporation lors du marquage des cibles et il faut donc corriger le biais dû au marquage. Par exemple, l'intensité du Cy3 est très souvent plus haute que l'intensité du Cy5.

La première étape consiste à représenter les données sous forme d'un graphe M-A qui permet de visualiser les biais de marquage. Ce graphe représente la différence des signaux (M) en fonction du signal moyen du gène (A). En notant R l'intensité médiane des pixels du signal rouge et V l'intensité médiane des pixels du signal vert, on a $M = log_2(R/V)$ et $A = log_2 (RV)/2$. Par la suite, on appellera M le « log-ratio ». L'avantage de la visualisation M-A par rapport à une visualisation « Cy5 versus Cy3 » est de mettre en évidence l'interaction entre le niveau moyen d'expression du gène et le fluorochrome. Si un gène est toujours plus exprimé dans le peuplier incliné, son log-ratio sera positif pour incliné/témoin et négatif pour un gène réprimé. La figure 11 illustre le type de variations du profil d'expression que nous pouvons observer. Nous présentons en annexe 5 un tableau récapitulatif des gènes dont l'expression varie de manière significative entre les conditions témoin et incliné.

D.8 Analyse des lames

Les analyses transcriptomiques ont été effectuées à l'INRA, Centre d'Orléans, Unité « Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières » par Jean-Charles Leplé.
Pour l'analyse nous avons utilisé la procédure Anapuce (Martin-Magniette et Robin 2004), développée à l'URGV par Marie Laure Martin-Magniette et Julie Aubert disponible sur le site : http://www.inapg.inra.fr/ens_rech/mathinfo/recherche:mathematique.outil.html. Par la suite, on appellera un gène « différentiellement » exprimé un gène exprimé de manière différentielle entre témoin et incliné, c'est-à-dire dont la quantité présente est significativement différente entre les deux traitements.

E. Analyses par électrophorèse bidimensionnelle

E.1 Préparation des échantillons

E.1.1 Solubilisation des protéines

La solubilisation des protéines a été réalisée selon le protocole modifié de Pionneau et *al.* (1998). L'échantillon est réduit en poudre à sec et au froid (azote liquide). La poudre est resuspendue dans la solution de broyage (acide trichloroacétique 10% et mercaptoéthanol 0,07% dans l'acétone) et incubée 1h à -20°C. La suspension est centrifugée à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans la solution de rinçage (mercaptoéthanol 0,07% dans l'acétone) et extrait 1 heure à -20°C. La centrifugation est répétée, le surnageant éliminé et le culot séché à froid sous vide. Le culot est ensuite dissout dans la solution de resolubilisation (60µl/mg de culot sec) (Urée 7M, Thiourée 2M, CHAPS, 4%, 50mM DTT, 0.5% ampholytes porteurs pH4-7, Triton X-100 6%). Après 1 heure d'extraction à température ambiante, la solution est centrifugée (14 000 rpm, 10 minutes). Le surnageant peut être conservé à -80°C avant utilisation.

L'urée et la thiourée sont des chaotropes. Ils vont ainsi promouvoir la dénaturation et la solubilisation des protéines en chaînes polypeptidiques, en cassant les interactions non covalentes. L'adjonction de thiourée à l'urée augmente le caractère chaotrope et conduit à une meilleure solubilisation de nombreuses protéines (Rabilloud et *al.* 1997). Le CHAPS, détergent zwitterionique, et le Triton X-100, détergent non ionique, participent à la solubilisation et à la prévention de la précipitation des protéines. Les ampholytes augmentent la solubilité et assurent une conductibilité uniforme au cours de la focalisation. Enfin, le DTT permet de couper les ponts disulfure intra- et inter-moléculaires permettant le dépliement total de la protéine.

E.1.2 Dosage des protéines

La concentration des protéines de chaque échantillon est déterminée par la méthode de Bradford modifiée selon Ramagli et Rodriguez (1985). Cette méthode est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie en fonction de la concentration en protéines de l'échantillon. L'intensité de la coloration est mesurée à 595 nm, elle est proportionnelle à la

quantité de protéines présentes dans l'extrait. La quantité de protéines est déterminée d'après une gamme étalon établie à partir de concentrations croissantes d'albumine sérique bovine (annexe 6).

E.2 Gels d'électrophorèse 2D

L'électrophorèse 2D permet de séparer les protéines extraites de tige de peuplier selon deux dimensions. Les protéines sont séparées, tout d'abord, selon leur point isoélectrique (première dimension ou focalisation isoélectrique), puis selon leur masse moléculaire (deuxième dimension ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes). Les protéines sont ensuite visualisées par coloration au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie. Cette technique est appliquée à des tiges de peuplier inclinées ou non.

E.2.1 Focalisation isoélectrique

La première dimension est effectuée sur l'appareil Protean IEF Cell (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Nous avons utilisé des bandelettes IPG (Immobilised pH gradient) de 7, 11 ou de 17 cm de longueur, couvrant une gamme de pH allant de 4 à 7 ou de 3 à 10.

E.2.1.1 Réhydratation

Les bandelettes de gel d'isoélectrofocalisation de 17 cm (pH 3-10, Amersham Biosciences) sont réhydratées avec 300 µl de tampon de solubilisation (annexe 7) contenant 200 µg de protéines avec quelques grains de bleu de bromophénol. Les bandelettes de 11 cm (pH 4-7, Bio-Rad) sont réhydratées avec 200 µl de tampon de résolubilisation contenant 100 µg de protéines. Des bandelettes de 7 cm (pH 4-7, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) sont réhydratées avec 125 µl de tampon de solubilisation contenant 50 µg de protéines. Les bandelettes sont protégées de la déshydratation et de l'oxydation par environ 2 ml de paraffine. La réhydratation s'effectue à 20°C, pendant un minimum de 16h.

E.2.1.2 Migration

Un papier buvard imbibé d'eau Ultrapure est placé entre la bandelette réhydratée et chacune des électrodes du plateau de focalisation. Ces papiers ont pour but de faciliter le

passage du courant entre l'électrode et le gel et de piéger les sels issus de l'échantillon. Le programme de focalisation nécessite trois étapes à 20°C dont le voltage diffère selon l'utilisation d'une bandelette 7, 11 ou 17 cm :

- une phase de conditionnement (15 min à 250 V), permettant d'éliminer l'excès de sels ;
- une montée linéaire en voltage (de 250 à 4000 V pour une bandelette 7 cm, de 250 à 8000 V pour une bandelette 11 cm, de 250 à 10000 V pour une bandelette 17 cm) ;
- une phase de focalisation (5 h à 4000 V pour une bandelette 7 cm, 6 h à 8000 V pour une bandelette 11 cm ou 8 h à 10000 V pour une bandelette 17 cm). Enfin une étape à 500 V est appliquée jusqu'à l'arrêt du programme afin d'éviter la diffusion des protéines au sein du gel.

Les bandelettes peuvent alors être directement utilisées pour la deuxième dimension ou stockées à -80°C.

E.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les bandelettes IPG sont mises en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) qui se lie aux protéines en leur conférant une charge négative importante, noyant complètement les charges propres de la protéine. Cette propriété permet, sous l'action d'un courant, la migration des protéines de l'échantillon vers l'anode. Le gel d'acrylamide permet une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

E.2.2.1 Réduction/alkylation des molécules

Les bandelettes sont équilibrées 15 min dans 2 ml d'un tampon contenant 6 M urée, 2% (p/v) SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 30% (v/v) glycérol et 2% (p/v) DTT. Cette étape permet de saturer le gel en SDS et de réduire les protéines. Les bandelettes sont ensuite placées 15 min dans le même tampon en substituant le DTT par 2% (v/v) 4-vinylpyridine, permettant l'alkylation des protéines et du DTT résiduel. Quelques grains de bleu de bromophénol sont ajoutés à la solution d'alkylation afin de colorer la bandelette et suivre la migration des protéines.

E.2.2.2 Migration

Les bandelettes équilibrées sont alors déposées sur un gel composé de 12% d'acrylamide et enfoncées dans le gel de concentration (annexe 8). Les bandelettes 7 cm sont déposées sur un gel de petite dimension (8 x 8 cm) et les bandelettes 11 ou 17 cm sur un gel de grande dimension (20 x 20 cm). Dix µl de marqueurs de masse moléculaire « Silver stain SDS-PAGE » de faible gamme (14,4 à 97,4 KDa) (Bio-Rad, France) sont déposés sur un côté du gel.

Pour les petits gels, une tension constante de 200 V est appliquée pendant 45 min. Pour les grands gels, un ampérage par gel de 20 mA est appliqué pendant 30 min puis 40 mA par gel jusqu'à la fin de la migration.

E.2.3 Coloration des protéines

E.2.3.1 Coloration au nitrate d'argent

La coloration utilisée est celle décrite par Blum et *al.* (1987).
A la fin de la seconde dimension, les gels sont fixés dans une solution de méthanol 50% v/v, acide acétique 10% v/v, et formaldéhyde 0.1% v/v (Sigma) pendant une heure. Les gels sont rincés 2 fois pendant 20 min avec une solution d'éthanol 50% v/v, et 1 fois pendant 20 min avec une solution d'éthanol 30% v/v. Les gels sont ensuite placés 5 min dans une solution composée de thiosulfate de sodium 0.02% p/v (Sigma), lavés 4 fois à l'eau pendant 5 min et incubés pendant 20 min dans une solution de nitrate d'argent 0.2% p/v (Sigma) et formaldéhyde 0.1% v/v (Sigma) sous agitation. Après un lavage à l'eau 2 fois 20 min, les gels sont placés dans la solution de révélation (0.1% v/v formaldéhyde (Sigma), 6% p/v carbonate de sodium (Sigma), et 0.0004% p/v de thiosulfate de sodium (Sigma), sous agitation, jusqu'à apparition des spots. La réaction est arrêtée en plongeant les gels dans de l'acide acétique 1%. Les gels sont conservés dans une solution d'acide acétique 1%.

E.2.3.2 Coloration au bleu de Coomassie

La coloration utilisée est adaptée de celle de Laurière et *al.* (1996). Les gels sont incubés 1 heure dans une solution de fixation composée de 42% méthanol (v/v), 60% TCA

(v/v), puis dans une solution de coloration (méthanol 50%, acide orthophosphorique 2% v/v (Sigma), sulfate d'ammonium 10% p/v (Sigma), et bleu de Coomassie G-250 (Sigma) 0.4% p/v) pendant 48 h. Les gels sont alors décolorés à l'eau, en changeant l'eau toutes les 20 min, jusqu'à ce que le rapport entre l'intensité des spots et le bruit de fond soit satisfaisant. Cette coloration est compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse.

E.2.4 Analyse qualitative et quantitative informatisée des gels

Les cartes bidimensionnelles des protéines de tige de peuplier témoins ou inclinées sont comparées entre elles et les spots quantifiés afin de rechercher d'éventuelles variations dans le contenu protéique en fonction du contexte d'inclinaison. Cette étape est réalisée à l'aide du logiciel PDQuest v7.0.1 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Ce logiciel convertit un signal provenant de données biologiques en données numériques et décompose chaque objet détecté selon le nombre de pixels qui le représente. PDQuest attribue à chaque pixel des coordonnées x, y et z. Les coordonnées x et y représentent la position du pixel sur un axe horizontal et vertical et la valeur z représente l'intensité du signal. Cette dernière valeur permet de quantifier un objet (nos spots) en groupant les pixels qui le composent. L'intensité de signal moyenne est calculée en additionnant les valeurs d'intensité de chaque pixel et en divisant le total par le nombre de pixels qui composent l'objet. Pour qu'un objet soit visible et quantifiable, il faut que l'intensité totale de cet objet soit supérieure à l'intensité des pixels qui représentent le bruit de fond de l'image. Pour effectuer la comparaison qualitative et quantitative des gels scannés, l'analyse par le logiciel PDQuest peut être détaillée en plusieurs étapes dont certaines sont automatiques et d'autres doivent être validées et complétées par l'utilisateur.

E.2.4.1 Détection automatique des spots et nettoyage des images

Après avoir scanné les gels (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, France), il faut définir les paramètres qui vont permettre au programme de fixer un seuil de détection (spot de plus faible intensité, de plus petite et de plus grande taille ainsi qu'une zone représentative du bruit de fond). Après la détection automatique des spots de nos gels, une étape de "nettoyage" manuelle est alors nécessaire. En effet, des traînées, des particules d'argent, des bulles et des poussières sont également détectées comme des spots et il est

nécessaire de les écarter de l'analyse. Les spots résultant de cette étape sont appelés "spots validés".

E.2.4.2 Appariement des spots (ou "matching")

Cette étape consiste à associer, sur les différents gels analysés, les spots identiques entre eux. Ceci est effectué automatiquement mais nécessite que l'utilisateur définisse des points d'ancrage (ou "landmarks") qui permettent au programme de fixer des points de repère et de compenser d'éventuelles déformations des gels. Pour un appariement correct, il faut indiquer manuellement au moins 10% de spots validés comme "landmarks", répartis sur l'ensemble du gel. Cependant, dans les zones contenant beaucoup de spots, il est parfois nécessaire d'en assigner une plus grande quantité ou de corriger manuellement certaines erreurs d'appariement du programme. Une fois que le logiciel a apparié la totalité des spots, l'analyse quantitative peut être réalisée. Pour cela, un des gels est désigné comme gel de référence afin de créer un gel "master" synthétique regroupant les données de tous les spots des gels de l'analyse.

E.2.4.3 Normalisation des gels et analyse des données

Une certaine variabilité dans la taille des spots ou leur intensité peut être due à des facteurs expérimentaux (perte d'échantillon au cours des préparations, mauvais transfert des protéines de la première vers la deuxième dimension, variation de temps de coloration des gels, etc.). Afin d'effectuer une comparaison fiable des taux d'abondance des protéines, il faut pouvoir compenser ces variations indépendantes du contexte biologique. Pour cela, une normalisation est réalisée pour chaque expérience. Il existe plusieurs manières de normaliser les gels : par rapport à un groupe de spots dont on sait que l'intensité ne varie pas, par rapport à la densité totale du gel ou par rapport à l'ensemble des spots validés. Ne connaissant pas les spots invariants, nous avons choisi de normaliser par rapport aux spots valides. La totalité des informations de chaque spot détecté (surface, densité, quantité) est regroupée sur le gel "master". Le logiciel peut alors mettre en évidence les spots dont l'intensité augmente ou diminue d'un gel à l'autre selon un facteur déterminé. L'ensemble de ces données peut être exporté sous forme de fichiers Excel pour être analysé en détail.

E.2.5 Identification des protéines par spectrométrie de masse

Les spots d'intérêt sont excisés des gels en utilisant un embout de pipette coupé comme emporte pièce. Les spots excisés sont conservés à -20°C dans des microtubes. L'identification d'un spot protéique issu d'une analyse protéomique sur le peuplier est facilitée par le fait que le génome de ce modèle est entièrement séquencé. Ainsi, l'empreinte trypsique de la protéine comparée à l'empreinte virtuelle contenue dans les banques de donnée peut suffire à l'identification.

E.2.5.1 Digestion des protéines et extraction des peptides générés

Le fait de décolorer les spots avant de les digérer élimine les problèmes dus aux restes de colorant et améliore la détection ultérieure des signaux peptidiques par spectrométrie de masse (Gharahdaghi et *al.*, 1999). Suite à l'analyse des gels colorés au bleu de Coomassie, les spots dont l'intensité est modulée sont excisés puis immergés dans 100 µl d'une solution bicarbonate d'ammonium 25 mM (NH_4 HCO_3), acétonitrile 5% (ACN). Après 30 min d'agitation, la solution est éliminée. Les échantillons sont incubés 30 min dans 100µl d'une solution composée du mélange de bicarbonate d'ammonium 25 mM (NH_4 HCO_3) et d'ACN 50%. Cette opération est répétée une seconde fois, la solution étant chaque fois éliminée.

Les morceaux de gels sont alors déshydratés dans 200 µl d'ACN pur (10 min, sous agitation). Après élimination de la solution, les morceaux de gel sont séchés sous vide pendant 10 minutes (Speed-vac). Les échantillons peuvent êtres stockés à – 20°C.
La digestion consiste à réhydrater les morceaux de gel avec une solution de trypsine à 15 ng/µl dans du tampon NH_4HCO_3 25 mM. Les échantillons sont incubés une nuit ou 5h à 37°C. Les peptides sont extraits par 8 µl d'acétonitrile pur pendant 15 min à 37°C.

E.2.5.2 Analyse des échantillons par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les analyses des fragments trypsiques ont été effectuées par spectrométrie de masse MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight (Perseptive BioSystems, Farmingham, MA) à la plate-forme protéomique de l'INRA de Theix (Clermont-

Ferrand). Elle a été réalisée par le personnel technique de la plate-forme (Christophe Chambon).

Cette technique, particulièrement sensible, permet de mesurer la masse de peptides présents dans un mélange à une concentration subpicomolaire. De plus, grâce à une calibration interne et dans certaines conditions d'analyse (mode réflectron), une précision de masse très élevée (< 50 ppm) peut être obtenue. Un tel niveau de précision est indispensable à l'utilisation de la spectrométrie de masse comme technique précise d'identification de protéines (Corthals et *al.*, 2000). Cette technique est basée sur l'analyse de l'échantillon co-cristallisé avec une matrice (acide α-cyano hydroxycinnamique) selon la préparation "sandwich" décrite par Kussmann et *al.* (1997). L'ensemble est bombardé par un rayon laser. La matrice, en excès par rapport à l'échantillon, le protège des radiations laser et isole les molécules à analyser les unes des autres, prévenant la formation de conglomérats. L'énergie du laser est absorbée par les co-cristaux et provoque le passage en phase gazeuse de la matrice et de l'analyte (Yates, 1998). Il y a un mécanisme de transfert de protons de la matrice vers les peptides donnant des ions préférentiellement monochargés ($[M^+H]^+$). Les ions produits au niveau de la source sont ensuite accélérés par un champ électrique uniforme avec une extraction retardée (200 ns) puis traversent un tube de vol, libre de champ, où ils volent jusqu'à l'analyseur selon une vitesse inversement proportionnelle au rapport masse sur charge (les ions les plus chargés et les plus légers atteignent le détecteur les premiers). Une calibration interne est effectuée en utilisant les fragments d'autolyse de la trypsine ($[M^+H]^+$ à m/z 842,510, 1045,546 et 2211,104). L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF permet ainsi d'obtenir une liste de masses des différents fragments de la protéine obtenus après la digestion trypsique.

E.2.5.3 Analyse des échantillons par spectrométrie de masse LC-MS/MS

Les analyses MS/MS ont été effectuées par Christophe Chambon à la plate-forme protéomique de l'INRA de Theix (Clermont-Ferrand) avec un spectromètre de masse LC-MS/MS (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). Elle a été réalisée par le personnel technique de la plate-forme.

L'information supplémentaire que l'on utilise dans cette méthode est une information de masse directement liée à l'enchaînement en acides aminés du peptide analysé. En mesure MS/MS, l'information est très spécifique, on obtient "une empreinte génétique",

contrairement à l'empreinte MS obtenue en MALDI-TOF qui serait digitale. Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur MS1 (Figure 7). Parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné (MS1 est utilisé comme filtre d'ions). Seuls les ions ayant le rapport m/z sélectionné pourront sortir de MS1. Ils vont alors rentrer dans une cellule de collision contenant des molécules de gaz neutres placées dans une chambre de collision. Les collisions vont augmenter leur énergie interne de manière à provoquer la rupture de certaines liaisons chimiques dans la molécule et ainsi fournir des ions fils, dont le rapport m/z sera analysé dans l'analyseur MS2. L'analyse des fragments obtenus (spectre MS/MS) permet de déterminer des éléments de la séquence en acides aminés du peptide (Hunt et *al.*, 1986). Cette séquence sera utilisée pour chercher à identifier la protéine dans les banques de données (Eng et *al.*, 1994).

E.2.5.4 Identification des protéines par recherche dans les banques de données

Dans la mesure où le génome de peuplier est connu, l'analyse des masses et des séquences des fragments trypsiques dans des banques de données protéiques et génomiques est facilitée. Ainsi, les valeurs de masse mesurées et les séquences obtenues sont comparées, en utilisant les outils informatiques disponibles sur la plate-forme protéomique de l'INRA de Theix avec les valeurs calculées contenues dans les banques de données spécialisées. Cette comparaison est associée à une valeur (ou « score ») fondée sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus, dont les masses et les séquences peuvent correspondre à celles des fragments protéolytiques des banques de données. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables. On peut ainsi caractériser une protéine connue grâce à une mesure de masses et/ou comparaison de séquences. L'identification des peptides est réalisée en utilisant le moteur de recherche MASCOT (www.matrixsciences.com) dont une version résidente est disponible à l'INRA de Theix. L'interrogation a été effectuée sur une base de données dont les spécificités sont détaillées dans l'article (voir page 76).

F. Etude de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative

L'expérience a pour objectif une étude cinétique de la transcription de certains gènes codant pour des protéines visualisées sur gel 2D et variant significativement après l'inclinaison.

Afin d'étudier la régulation de ces gènes et vérifier si celle-ci dépend du temps d'inclinaison, l'expression de ces gènes a été étudiée au cours d'une cinétique par PCR quantitative.

F.1 Plan de l'expérience

Les peupliers sont inclinés de 35°. Les parties supérieures et inférieures de ces peupliers ont été prélevées après différents temps d'inclinaison à l'obscurité (Figure 12).
Le temps t_0 correspond au témoin droit, le temps t_1 correspond à 10 min d'inclinaison, les temps t_2, t_3, t_4, t_5, t_6 et t_7 correspondent respectivement à 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 3 h, et à 6 h d'inclinaison.

Nous avons réalisé deux répétitions. Ainsi, pour chaque temps, le prélèvement des tissus analysés a été fait sur deux plantes. Ceci nous permet de prendre en compte la variabilité biologique dans le traitement des données.

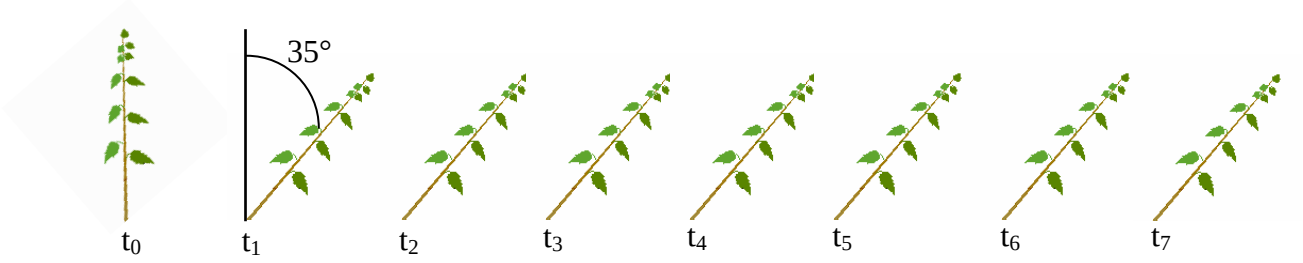


Figure 12: Schéma de l'expérience en cinétique. Le temps t_0 correspond au témoin droit, les temps t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_6, et t_7 correspondent à 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1h, 3h et à 6h d'inclinaison.

F.2 La RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) quantitative, basée sur la PCR classique, permet de suivre en temps réel l'évolution de la quantité d'ADN synthétisé au cours des cycles, grâce à une sonde spécifique du gène d'intérêt couplée à un fluorophore, le SyberGreen (Sigma, S^t-Louis, Mo, USA), qui émet une forte fluorescence en

se fixant sur les doubles brins d'ADN. Cette technique possède l'avantage d'être très sensible, spécifique et rapide.

F.2.2 Transcription inverse

Avant la transcription inverse les ARN totaux ont été traités avec la DNase RNase free RQ1 (Promega, Madison, WI, USA) et un inhibiteur de RNase (RNasin, CA, USA) suivant les instructions du fournisseur afin d'éliminer les contaminations dues à l'ADN génomique. Ensuite, La transcription inverse a été réalisée sur 2 µg d'ARN en suivant les instructions du Kit SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, Groningen, The Netherland). Le mélange est composé de 2 µl du tampon de transcription inverse (RT 10X), 1 µl de SuperScript III RT (200U/µl), 1µl de RNase OUT (40U/µl), dNTPs (10 mM), Oligo $(dT)_{20}$ (50 µM), $MgCl_2$ (25 mM) et DTT (0.1 M) dans un volume totale de 20µl. La réaction se déroule pendant 5 min à 65°C, 1 h 30 à 50°C, 10 min à 70°C et 20 min à 37°C.

F.2.3 PCR quantitative en temps réel

La PCR est réalisée sur les ADN complémentaires obtenus. Des amorces spécifiques pour les gènes d'intérêts, ainsi que pour le gène codant la protéine ribosomale 18S qui sert de référence, ont été dessinées grâce à un outil disponible en ligne (Primer3, http://frodo.wi.mit.edu) et fabriquées par la société Eurogentec (Eurogentec, Liège, Belgique). Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont reportées en annexe 9.

La réaction est réalisée grâce à un i-Cycler (Bio-Rad laboratoires, Hercules, CA, USA) sur des plaques de 96 puits dans lesquels 4 µl d'ADNc (dilué au 1/20 par rapport à la solution initiale d'ADNc) de chaque échantillons sont déposés dans un mélange composé des amorces (10 µM), de tampon réactionnel (PCR 10 X), de $MgCl_2$ (25 mM), de dNTPs (10 mM), 0.25 µl de SyberGreen (solution diluée au 1/10 000), 0.12 µl d'enzyme Taq platinium DNA Polymerase (5U/µl) (Invitrogen, Groningen, The Netherland), et d'eau en quantité suffisante pour 25 µl. Les échantillons sont déposés au moins en triplicats techniques indépendants et duplicats biologiques indépendants. Les fragments amplifiés lors de la PCR sont détectés grâce au SyberGreen ajouté dans le milieu réactionnel. La lecture de la fluorescence émise par le SyberGreen se fait à la fin de chaque cycle d'élongation. La PCR est effectuée selon le programme suivant : dénaturation 95°C pour 4 min ; 40 cycles de dénaturation 10 s à 95°C,

hybridation 30 s à des temératures comprises entre 55 et 61°C selon les expériences, et extension 30 s à 72°C. La quantification du changement relatif des niveaux d'expression d'ARNs a été calculé en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct = (Ct, _{Cible} - Ct, _{18S\ ARN})_{Temps\ x} - (Ct, _{Cible} - Ct, _{18S\ ARN})_{Temps\ 0}$ après normalisation avec le niveau d'expression des transcrits de ARN 18S (annexe 10) comme décrit par Livak et Schmittgen (2001).

G. Western blots

G.1 Migration et transfert

Quarante µg de protéines totales extraites des entre-nœuds inférieurs et supérieurs de tige de peuplier témoin et inclinée de 35° durant 45 min et une semaine, sont séparées sur SDS-PAGE (12.5%). La migration est conduite à 50 mA durant 1 h, puis à 80 mA jusqu'à que le bleu de Bromophénol sorte du gel. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de Nitrocellulose (Amersham Biosciences). Le transfert s'effectue pendant 1 h à 100V et à 4°C dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol, pH 8.4), en utilisant un système Mini-TransBlot transfert cell (Bio-Rad, Minnesota St., San Francisco). Après transfert, les protéines sont colorées au rouge S-Ponceau afin de vérifier que la migration et le transfert des protéines sont corrects, puis rincées dans de l'eau distillée. L'immunodétection est réalisée grâce à un anticorps dirigé contre la protéine Trx h1 et un anticorps dirigé contre la protéine Trx h2, fourni par Nicolas Rouhier Université Henry Poincaré, (Nancy). L'anticorps primaire est détecté en utilisant un anticorps anti-lapin (AP-conjugated anti-rabbit, Bio-Rad), et l'anticorps secondaire *via* le kit *ECL plus* (Amersham Bioscience).

G.2 Immunodétection

Après lavage de la membrane de nitrocellulose 3 fois pendant 5 min dans du tampon TBS 1x (annexe 11), les sites aspécifiques sont saturés pendant 15 min dans du tampon TBS 1x et 0.2% Tween-20 sous légère agitation. Après 3 rinçages de 5 min dans du TBS 1x, les membranes sont incubées 2 h en présence de l'anticorps primaire dilué au 1/1000 dans du tampon TBS 1x. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois pendant 5 min au TBS 1x pour éliminer l'excès d'anticorps primaire, puis saturées pendant 15 min dans du tampon TBS 1x et 0.2% Tween-20. Après saturation les membranes sont incubées en présence de l'anticorps

secondaire anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline diluée au 1/30000 dans du TBS 1x et BSA 1%. Après 3 nouveaux rinçages au TBS 1x, la révélation s'effectue à l'aide du kit *ECL plus* (Amersham Biosciences).

H. Immunolocalisation *in situ*

H.1 Saturation des sites non spécifiques

Les coupes d'environ 2 µm d'épaisseur réalisées à partir du bloc de résine (voir C.1.1) à l'aide d'un microtome (Reichert, Om U2) sont déposées dans des coupelles en verre contenant du PBS 1X (annexe 11), pendant 10 min à température ambiante. Les coupes sont alors incubées 15 min dans une solution PBS 1X + Triton X-100 0.1%, suivi de 15 min dans une solution PBS 1X + Triton X-100 0.1% + Glycine 0.2 %, puis 10 min dans une solution PBS 1X + Triton X-100 0.1% et enfin 45 min avec une solution PBS 1X + Triton X-100 0.1% + Tween 20 0.2 % + BSA 0.1 % + NGS (Normal Goat Serum) 5 % (à l'obscurité) afin de saturer les sites non spécifiques.

H.2 Réaction avec l'anticorps primaire

Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation précédent (PBS 1X + Triton X-100 0.1% + Tween 20 0.2 % + BSA 0.1 % + NGS 5 %) une nuit à l'obscurité et à température ambiante. Elles sont ensuite lavées 2 fois 20 min à température ambiante avec une solution PBS 1X + Triton X-100 0.1% et 2 fois 15 min à température ambiante avec une solution TBS pH 8.2 (annexe 11) + Triton X-100 0.2% afin d'éliminer l'anticorps en excès.

H.3 Saturation des sites non spécifiques

Les coupes sont incubées 45 min à l'obscurité et à température ambiante avec la solution de saturation suivante : TBS pH 8.2 + Triton X-100 0.2% + Tween 20 0.2% + BSA 1% + NGS 5%.

H.4 Dépôt de l'anticorps secondaire

Les coupes peuvent alors être incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/40ème (Goat Anti-Rabbit, Sigma) pendant 2 h 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Elles sont ensuite lavées 3 fois 20 min à température ambiante avec une solution TBS pH 8.2 + Triton X-100 0.2%.

H.5 Réaction de coloration

Pour la révélation, le kit « Alkaline Phosphatase Conjugate Substrat kit » (Bio-Rad) a été utilisé.

Les coupes sont incubées 10 min à température ambiante avec le tampon de révélation 1X (fourni dans le kit), puis dans un mélange contenant : 1 ml de solution A (= AP color reagent A = NBT), 1 ml de solution B (= AP color reagent B = BCIP) et 10 ml de tampon 1X. La réaction est arrêtée par immersion des coupes 2 fois 10 min dans l'eau. Les coupes sont ensuite récupérées, séchées et déposées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (Euromedex, Mündelshein, France).

Partie 3 : Résultats

Chapitre I

Coupes anatomiques

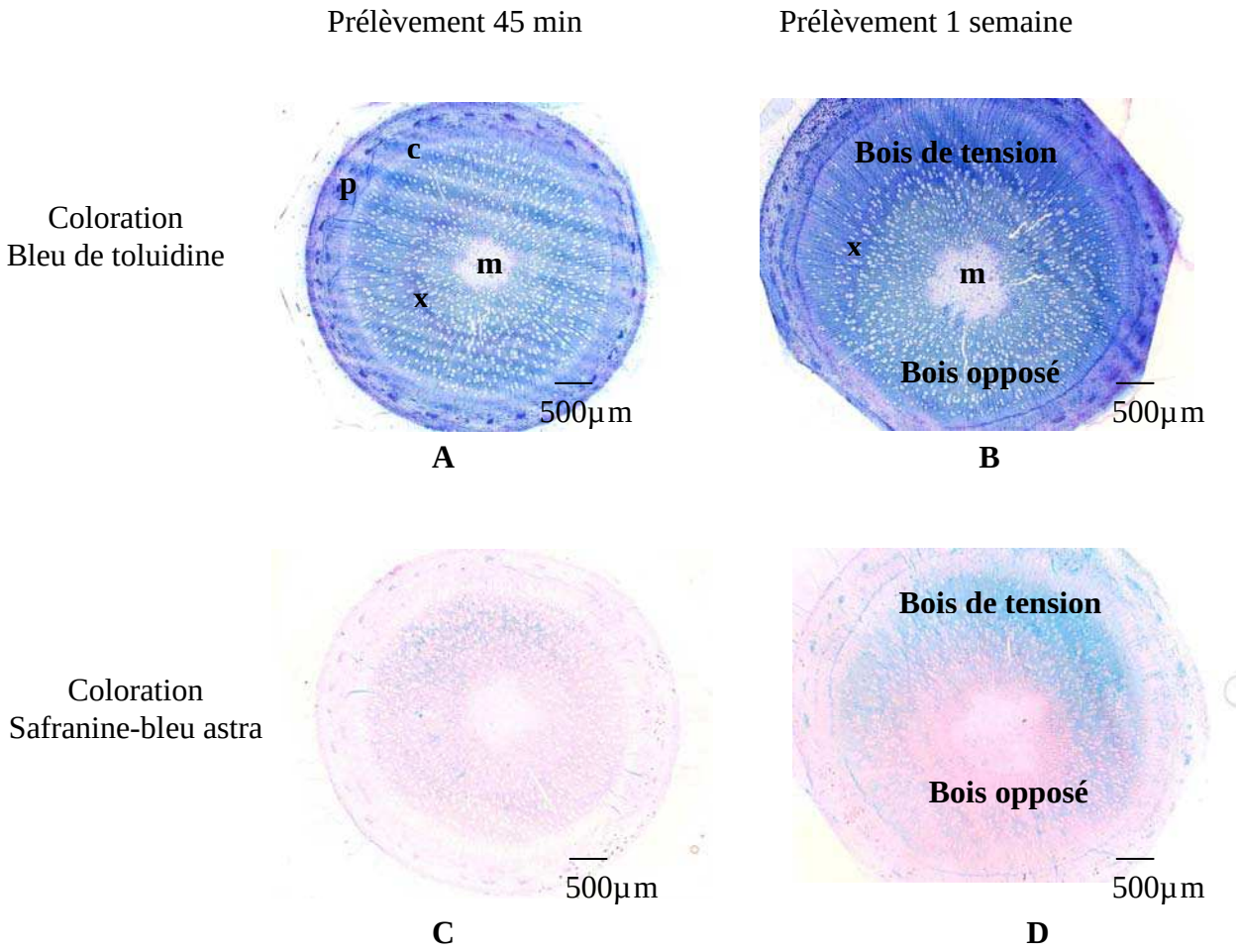


Figure 13 : Coupes transversales des entre-nœuds inférieurs de peupliers inclinés de 35° colorées au bleu de toluidine (A, B) ou par la safranine-bleu astra (C, D). Les coupes effectuées sur les entre-nœuds inférieurs sont issues de peupliers inclinés de 35° durant 45 min (A, C) ou durant une semaine (B, D).

c : cambium, p : phloème, x : xylème, m : moëlle

A. Coupes anatomiques

A.1 Formation du bois de tension

Des coupes anatomiques longitudinales et transversales ont été réalisées au niveau des entre nœuds supérieurs et inférieurs des peupliers, après 45 min et une semaine d'inclinaison. La présence du bois de tension a été mise en évidence au niveau des entre-nœuds inférieurs, une semaine après l'inclinaison par une double coloration à la safranine et au bleu-astra (Figure 13D). Observé sous microscope, le bois de tension apparaît très clairement en bleu, le bois opposé apparaît en rouge (Figure 13D). Aucun bois de tension n'a été observé chez les peupliers inclinés 45 min (Figure 13C). La coloration par le bleu de toluidine des coupes anatomiques transversales a permis d'observer que la moelle de la tige est excentrée chez les peupliers inclinés durant une semaine (Figure 13B), ce qui n'est pas le cas chez les peupliers inclinés 45 min (Figure 13A). Aucun bois de tension n'est mis en évidence au niveau des entre-nœuds supérieurs inclinés de 35° après 45 min ou une semaine d'inclinaison (Figure 14).

A.2 Mise en évidence des grains d'amidon

Des coupes anatomiques longitudinales et transversales, réalisées au niveau des entre nœuds supérieurs et inférieurs des peupliers puis colorées (bleu de toluidine 0.25% ou PAS) montrent la présence de grains d'amidon dans le parenchyme situé autour des ilots de sclérenchyme et dans quelques cellules au niveau de la zone phloémienne (Figure 15 D, E, I, J).

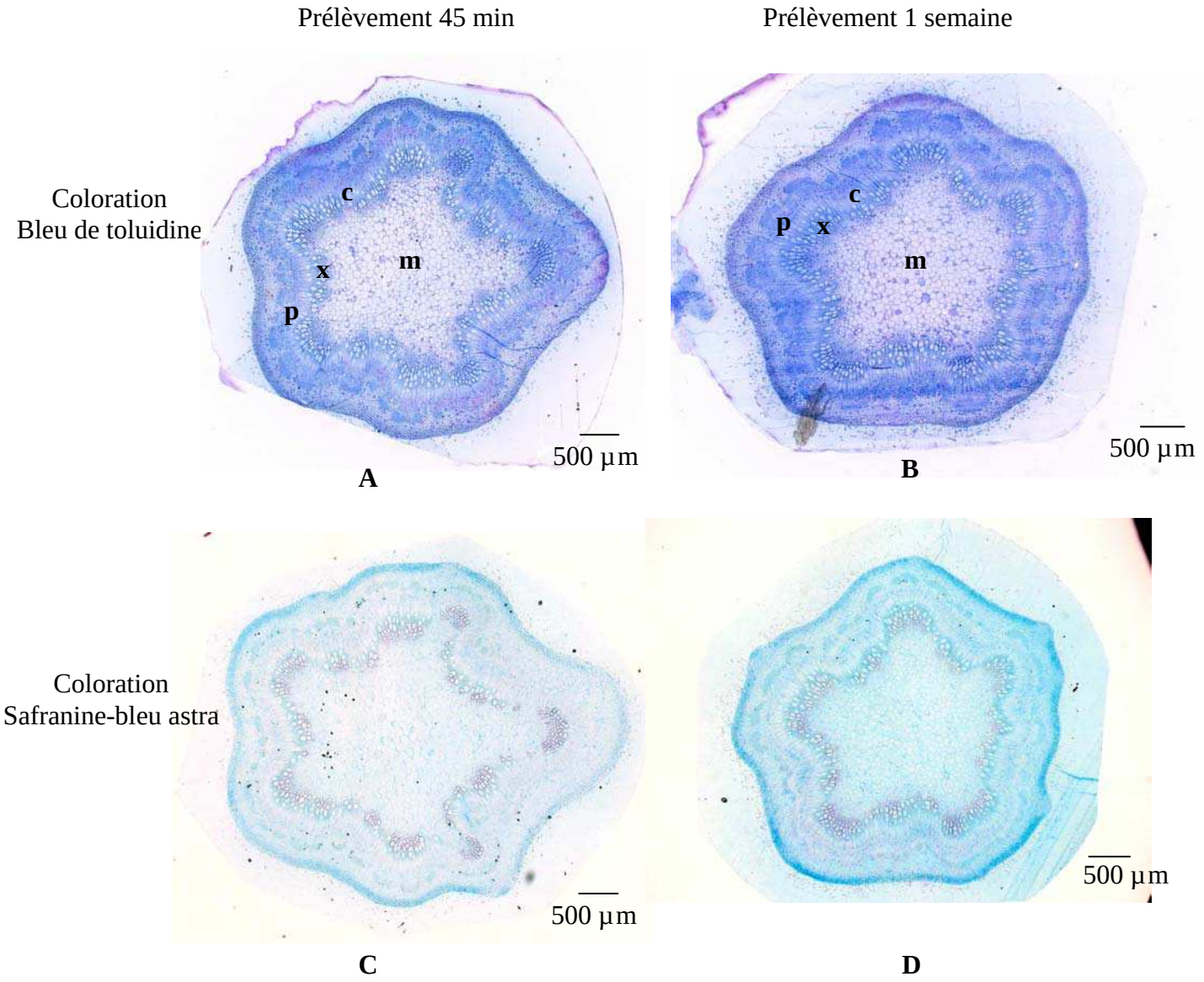


Figure 14 : Coupes transversales des entre-nœuds supérieurs de peupliers inclinés. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (A, B) ou par la safranine-bleu astra (C, D). Les entre-nœuds supérieurs ont été prélevés sur des peupliers inclinés de 35° durant 45 min (A, C) ou une semaine (B, D).

c : cambium, p : phloème, x : xylème, m : moëlle

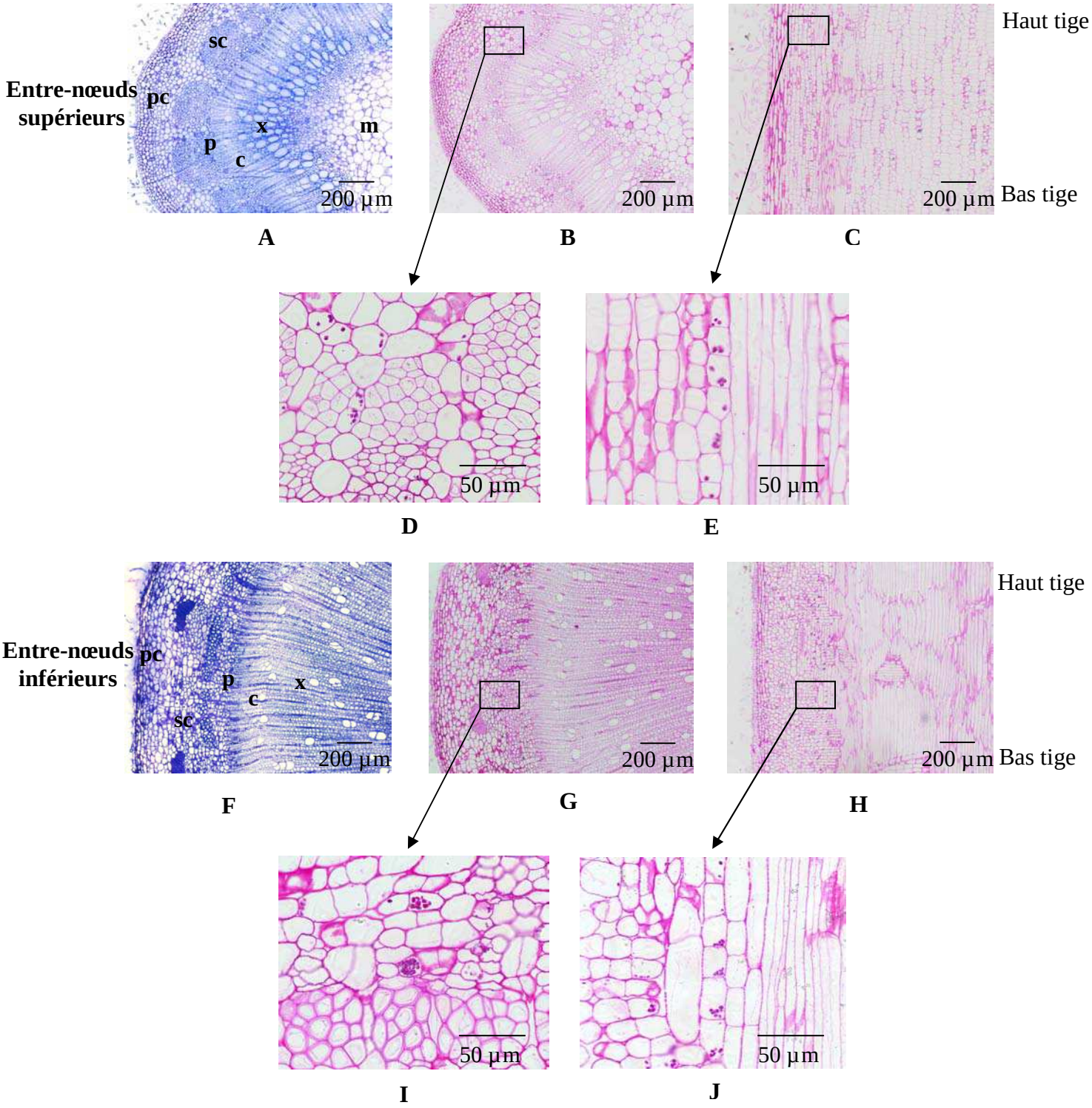


Figure 15 : Coupes transversales (A, B, D, F, G, I) et longitudinales (C, E, H, J) des entre-nœuds supérieurs et inférieurs de peupliers. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (A, F) ou par la technique PAS (Acide Periodique-Schiff) (B, C, D, E, G, H, I, J). Les images D, E, I, J sont respectivement les agrandissements des zones indiquées dans les images B, C, G, H. Les grains en rose foncé sont des grains d'amidon.

c : cambium, m : moëlle, p : phloème, pc : parenchyme cortical, sc : sclérenchyme, x : xylème

Chapitre II

Approche transcriptomique

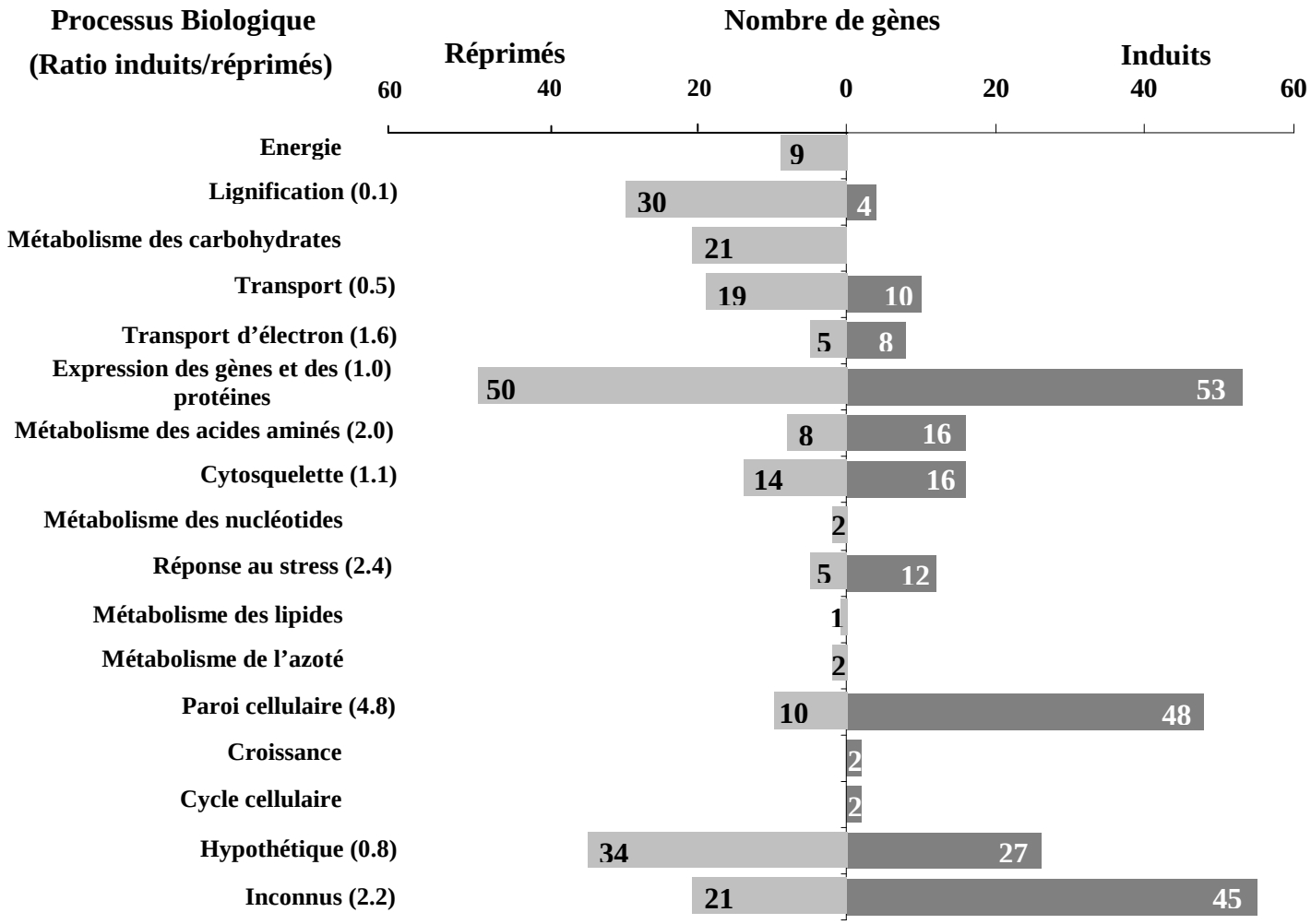


Figure 16 : Comparaison selon la classification fonctionnelle des gènes affectés par une stimulation gravitationnelle.

A. Approche transcriptomique

L'analyse transcriptomique a été effectuée à l'INRA d'Orléans, unité "Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières".

A.1 Importance des répétitions des mesures

Pour chaque condition étudiée, des entre nœuds supérieurs et inférieurs ont été prélevés sur deux plantes individuelles afin de tenir compte de la variabilité biologique. Pour chaque échantillon en effectuant 2 hybridations, 2 répétitions techniques ont été réalisées. Nous ne présenterons pas les résultats obtenus à partir des entre-nœuds supérieurs car, les deux répétitions biologiques donnent des résultats trop différents qui ne sont donc pas exploitables.

A.2 Identification des gènes dont l'expression est affectée par la gravité

L'analyse différentielle a été réalisée par la procédure Anapuce avec la méthode de Bonferroni avec un risque de première espèce de 5%.

Au total, sur les 15 000 gènes étudiés, 474 gènes sont différentiellement exprimés. Parmi ces 474 gènes, 243 gènes ont un log-ratio positif et 231 gènes ont un log-ratio négatif. Pour essayer de mieux percevoir les phénomènes induits par l'inclinaison, nous avons classé ces gènes selon des groupes fonctionnels (figure 16). Ils ont été classés dans 17 groupes basés sur des catégories fonctionnelles en utilisant l'annotation « Gene Ontology » pour *Populus trichocarpa* (http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi.annotation) (figure 17).
Nous avons noté que 171 et 176 gènes respectivement induits et réprimés lors de l'inclinaison ont des fonctions connues ou potentielles (figure 16). Soixante six et 61 gènes identifiés correspondent respectivement à des protéines inconnues et hypothétiques (figure 16).

Parmi les gènes impliqués dans la lignification, seulement 4 sont sur-exprimés tandis que 30 montrent une diminution de l'accumulation de transcrits (figure 16). D'une manière plus globale, la figure 16 montre une sous-expression des gènes impliqués dans la lignification, l'énergie, le métabolisme des carbohydrates, et le transport et une sur-

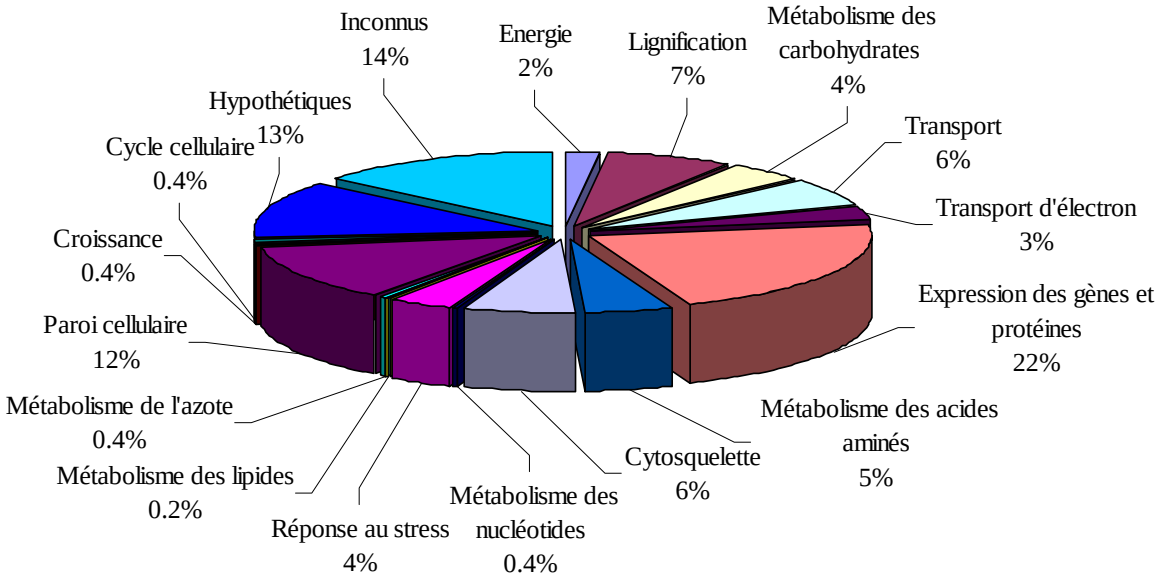


Figure 17 : Répartition en classes des catégories fonctionnelles des gènes dont l'expression est affectée par la gravité.

expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire, le métabolisme des acides aminés et la réponse au stress.

Parmi les gènes différentiellement exprimés, certains sont impliqués dans des fonctions biologiques très importantes telles que la biosynthèse de la cellulose (cellulose synthase), la biosynthèse de la lignine (phénylalanine amonia-lyase, s-adénosylméthionine décarboxylase, cinnamyl alcool dehydrogénase, caffeic acid 3-O-methyltransférase, caffeoyl-CoA O-méthyltransférase, et glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogénase), métabolisme des sucres (dTDP-glucose 4-6-dehydratase, UDP-glucose 4-epimérase, glycine hydroxyméthyltransférase, phosphoglucomutase, et glycoside hydrolase), la paroi cellulaire (Arabinogalactan, glycosyl transférase). Parmi les gènes de fonction connue, nous avons identifié 48 (14%) de type Arabinogalactane (AGPs). Ces protéines sont toutes sur-exprimées. On sait que ces gènes sont plus exprimés dans le bois tendu que dans le bois opposé (Déjardin et *al.*, 2004). L'expression différentielle de certains de ces gènes (PopFLA7, 4, 5, 15) a été confirmée par RT-PCR quantitative (figure 18).

Certains gènes différentiellement exprimés sont connus pour être d'importants médiateurs de la transduction du signal et pour être impliqués dans une grande variété de processus physiologiques tels que la défense et la réponse aux stress environnementaux (Calmoduline, GTPase activating protein, G-protein, MAPK, Disease resistance protein, Annexine, et Déhydrine Dhn1).

Neuf gènes ont été classés dans la catégorie métabolisme primaire, correspondent à des protéines H^+-ATP synthase et F0F1 ATP synthase.

Une autre voie métabolique fortement affectée par la gravité est celle de la biosynthèse des protéines. Nous avons identifié 18 gènes appartenant à cette voie et qui correspondent à des protéines 60S ribosomale L11, 60S ribosomale L44, 60S ribosomale L26, 60S ribosomale L36, et 60S ribosomal L37. De nombreuses autres voies métaboliques différentes sont affectées par la gravité. En effet, les gènes des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des nucléotides et des lipides, sont affectés par la gravité. Nous avons identifié 24 gènes appartenant au métabolisme des acides aminés, correspondent à des protéines de méthionine synthase II, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, Vitamin-B12-independent methionine synthase, U4/U6-associated splicing factor PRP4,

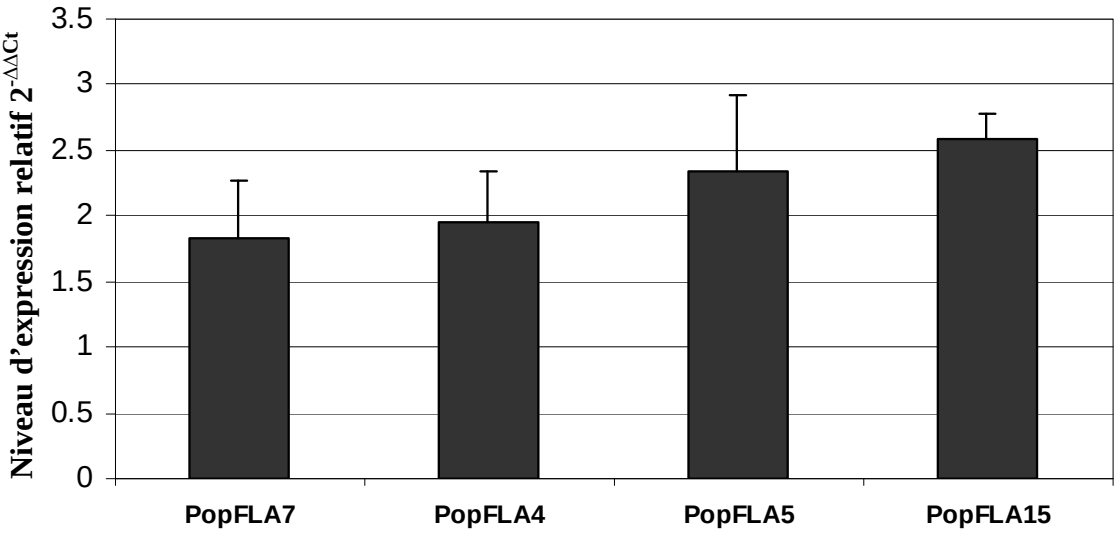


Figure 18: Profils d'expression relative obtenus par RT-PCR quantitative des gènes PopFLA 7, 4, 5, et 15. Les ARN totaux sont extraits des entre-noeuds inférieurs après 45 min d'inclinaison. L'expression des gènes a été normalisée avec le niveau d'expression des gènes références ARN 18S. Le niveau d'expression du peuplier témoin non incliné a été pris comme condition de référence dans le calcul pour déterminer le niveau « 1X » d'expression des gènes. Nous avons réalisé 2 répétitions. Les barres verticales indiquent les erreurs standards de 3 répétitions techniques.

tatricopeptide (PPR), Predicted aminopeptidase M17, et Asparaginyl peptidases. Deux gènes identifiés dans le métabolisme des nucléotides correspondent à la protéine Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin et un seul gène identifié dans le métabolisme des lipides correspond à la à la protéine protéase aspartyle.

.

Pour la catégorie "expression des gènes et des protéines" nous avons répertorié 103 gènes dont l'expression est modifiée par l'inclinaison. Un grand nombre (27) de ces gènes code pour un "*putative translation initiation factor* (*eIF*)."

Dans la catégorie cytosquelette, l'expression de 10 et 4 gènes, codant respectivement pour une α-tubuline et une ß-tubuline est modifiée par l'inclinaison. De plus un gène d'actine et 13 gènes codant pour des profilines sont aussi différentiellement exprimés lors de l'inclinaison.

Finalement, nous avons identifié 42 gènes différentiellement exprimés intervenant dans le transport, dont 16 codant pour des aquaporines impliqués dans le transport de l'eau. L'analyse transcriptomique montre que d'autres catégories de gènes sont affectées aussi par la gravité. Par exemple, les gènes des protéines impliquées dans la croissance, le cycle cellulaire et le métabolisme de l'azote (figure 16).

Chapitre III

Approche protéomique

Analyse du protéome des régions apicale et basale de tiges de peuplier soumises à une stimulation gravitationnelle

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la réponse gravitropique chez le peuplier, nous avons mis en place une expérience sur des jeunes plants de peuplier inclinés ou non de 35° par rapport à l'axe vertical. Nous avons cherché à identifier les régulations précoces (45 min) ou plus tardives (une semaine) mises en place en réponse à l'inclinaison, et ceci dans les zones en croissance primaire (région apicale) et les zones en croissance secondaire (région basale) de la tige par une analyse protéomique.

Au cours de l'application du stress, le profil protéique de peuplier évolue considérablement. Les variations qualitatives et quantitatives des spots colorés au nitrate d'argent ont été analysées. Les gels des conditions non inclinés (témoins) ont été utilisés comme référence dans l'analyse d'image.

Nous avons réalisé une analyse statistique (test *t*-student au seuil 5%) sur 3 répétitions de chaque échantillon, afin d'identifier les spots dont l'accumulation était significativement affectée par le stress. L'analyse a porté sur 285 spots pour les entre-nœuds supérieurs et inférieurs des tiges inclinées 45 minutes et 336 spots pour les entre-nœuds supérieurs et inférieurs des tiges inclinées une semaine.

Après coloration par le bleu de coomassie, les spots différentiellement régulés par l'inclinaison ont été prélevés et analysés par spectrométrie de masse. Soixante protéines ont été identifiées.
Les analyses montrent que la plupart de ces protéines sont régulées différemment dans les entre-noeuds supérieurs et inférieurs des tiges inclinées.

Le détail de ces expériences ainsi que la discussion des résultats sont présentés dans le manuscrit soumis à Physiologia plantarum est accepté pour publication.

Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation

Wassim Azri[1,5], Christophe Chambon[2], Stéphane Herbette[1], Nicole Brunel[1], Catherine Coutand[3], Jean-Charles Leplé[4], Ichrak Ben Rejeb[5], Saïda Ammar[5], Jean-Louis Julien[1], Patricia Roeckel-Drevet[1]

[1]*Université Blaise Pascal, UMR547 PIAF, 24 av des Landais, F-63177 Aubière*

[2] *UR370, Qualité des produits animaux, Plateforme Protéomique, INRA, F-63122 St Genès-Champanelle*

[3]*INRA,UMR547 PIAF, 134 av du Brézet, F-63100 Clermont-Ferrand*

[4] *INRA, Centre d'Orléans, Unité « Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières », 2613 av. de la Pomme-de-Pin, BP 20 619 Ardon, F-45166 Olivet cedex*

[5] *Laboratoire de biologie et physiologie végétales, département de biologie, faculté des sciences de Tunis, campus universitaire, 1060, Tunis, Tunisia*

Correspondence:

Professor Patricia Roeckel-Drevet

24 avenue des Landais - Université Blaise Pascal - UMR 547 PIAF INRA

63177 Aubière, France

Tel : (33) 473 40 79 12

Fax : (33) 473 40 79 16

Email :patricia.drevet@univ-bpclermont.fr

Abstract

Gravity is a constant force guiding the direction of plant growth. In young poplar stem, reorientation of the apical region is mainly obtained by differential growth of elongating primary tissues. At the base, where elongation is achieved but where the cambium is active, reorientation is due to asymmetrical formation of reaction wood. After 45 min of gravistimulation, the stem showed no reorientation, but one week later, reaction wood was observed at the base of the stem. To determine the molecular mechanisms taking place at the top and base of the stem, after 45 min or one week of inclination, the changes induced in protein accumulation were studied by 2D-PAGE and quantitatively analyzed using image analysis software. Around 300 protein spots were reproducibly detected and analyzed. Forty percent of these proteins showed significant changes after inclination. Mass spectrometry analysis of 135 spots led to the identification of 60 proteins involved in a wide range of activities and metabolisms. Very different patterns of protein expression were obtained according to conditions tested, highlighting the complexity of gravitropic responses. Our results suggest that primary and secondary tissues present specific mechanisms to sense reorientation and to respond to inclination. Some selected proteins are discussed.

Abbreviations

EF1α , elongation factor 1-alpha ; NDPK , Nucleoside diphosphate kinase ; OEE , Oxygen Evolving Enhancer ; PCBER , Phenylcoumaran benzylic ether reductase ; ROS , Reactive oxygen species ; SAM , S-adenosylmethionine synthase ; SOD , Superoxide dismutase ; TCTP , translationally controlled tumour protein.

Introduction

Gravity governs the organization and function of all life in the biosphere. In particular, gravity strongly influences the growth of plant organs, roots and shoots in order to ensure their correct orientation in space (Barlow 1995). In response to a gravity-derived stimulus caused by a change from the normal position, plant reaction will result in a bending moment which counterbalances the inclination imposed (Firn and Digby 1985). Two different motors enable axis curvature: (1) in zones of primary elongation growth, reorientation is obtained by differential growth, preferentially stimulated on one side of the organ (Cosgrove 1997); (2) in zones with an active cambium assuring radial growth, reorientation occurs by differential maturation between the two sides of the stem. In woody stems, in response to mechanical stress, asymmetrical formation of reaction wood by the cambium helps to position newly formed parts of the plant. The structure and chemical composition of reaction wood differ from those of normal wood (Fournier et al. 1994).

The way the gravitational force as an abiotic signal is translated into gravity-dependent phenomena and how this force generates plant structures maintaining adaptive strategies for survival are not clearly understood (Schnabl et al. 2002). It is widely accepted that one of the primary events in gravity sensing in higher plants involves the displacement or settling of dense starch-containing amyloplasts, which can occur in seconds to minutes depending on the plant tissue (Blancaflor and Masson 2003). The columella cells of the root cap and the endodermall cells surrounding the vascular tissue in plant shoots contain sedimented amyloplasts. How the displacement of amyloplasts might trigger a signalling cascade is still a matter of debate (Perera et al. 2006). Several different second messengers and proteins have been suggested to be involved in signal transduction of gravitropism (Chang et al. 2003, Perera et al. 2006). In addition, the gravistimulus must be transferred from the sensing cells to the responding cells. Recent studies have provided molecular evidence supporting the Cholodny-Went hypothesis (Cholodny 1927, Went 1933) which suggests that auxin is transported laterally and accumulates on the lower side of graviresponding tissue. Several possible events leading to differential auxin distribution within the sensing cells have been suggested recently (Morita and Tasaka 2004, Harrison and Masson 2008).

To date, only a few studies have reported differential gene expression profiles induced by gravity in herbaceous species (Moseyko et al. 2002, Centis-Aubay et al. 2003, Kimbrough et al. 2004). The results recently obtained in the field of genomics on reaction wood have been reviewed (Andersson-Gunneras et al. 2006). Since it is well documented that regulation of cellular events can be determined by proteins with no apparent change in mRNA steady

state levels, proteomic analysis should provide important information. The first proteomic analysis on gravitropism was conducted on Arabidopsis root (Kamada et al. 2005).

In this report, we present studies on proteins isolated from young poplar stem after inclination. To our knowledge, this approach is the first conducted on woody angiosperm species, which develop reaction wood known as tension wood showing specific structure, chemical composition and kinetics of formation (Fournier et al. 1994, Coutand et al. 2007). We chose to analyze two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) patterns of proteins extracted from the top and the base of the stem, in order to check if regulatory mechanisms differ between zones showing preponderant primary elongation growth and radial growth respectively. To appreciate early and late changes, protein expression was monitored at 45 min and one week after inclination, corresponding respectively to early stress perception before reorientation of the axis and to reaction wood formation.

Materials and methods

Plant materials and culture conditions

Hybrid poplar (*Populus tremula x Populus alba*), clone INRA n° 717-1-B4 was obtained from Dr. G. Pilate (INRA Orléans, France). This plant material was multiplied clonally *in vitro* on Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962). After vegetative multiplication, the deep-rooted micro-plantations were acclimatized in hydropony (Herbette et al. 2004) and then kept in a controlled environment growth chamber (16h photoperiod at 60 µmols.m^{-2}.s^{-1}, 22°C/18°C (day/night) and 70% of relative humidity) . At the 14 internodes stage, the poplars showing straight stems were transferred on a new device that can tilt them in a controlled manner. Mineral solution and growth chamber environment were not modified.

Inclination of the stems

After one week on the device in a straight position, poplars showing 20 developed internodes were inclined at 35° from the vertical axis for 45 min. This angle value caused gravitropic response of the stems without initiation of secondary branching (data not shown). Plants were inclined 1h before light in order to avoid phototropism for the 45 min treatment as far as possible. Some of the plants were kept inclined for one week. At the end of the week, the plants had 26 developed internodes. Starting from the base, internodes 1 to 5 (showing preponderant secondary growth), 13 to 20 (for the 45 min condition – zone of preponderant primary growth) and 19 to 26 (for the one week condition – zone of preponderant primary growth) were harvested from inclined and non inclined plants, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction.

Protein extraction and 2-D-PAGE

For each treatment (45 min and one week), five stems were tilted and 5 stems were used as controls with two sets of plants. For each condition (inclined / control – 45 min / 1 week), the internodes from the two biological replicates were pooled and ground in liquid nitrogen. Three replicate protein preparations were isolated from each sample. The fine powder was suspended in ice-cold 20% w/v TCA in acetone containing 0.07% v/v β-mercaptoethanol, incubated at -20°C for 1 h and centrifuged for 15 min at 13 000 rpm. The pellets were suspended in 0.07% v/v β-mercaptoethanol in acetone, incubated at -20°C for 1 h and centrifuged for 15 min at 13 000 rpm. The pellets were dried under vacuum, then solubilized in preparation buffer (7 M urea , 2 M thiourea, 50 mM DTT, 4% w/v CHAPS, 1% v/v pH 4-7 IPG buffer, 0.4% (v/v) Triton X 100) for 1 h at room temperature. This was followed by centrifugation for 15 min at 12 000 rpm to remove unsolubilized materials. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Ramagli and Rodriguez 1985) using bovine serum albumin as standard.

For 2-DE, 100 µg and 200 µg of proteins were loaded onto analytical and preparative gels, respectively. For IEF, pH 4-7 IPG strips (11 cm, linear) were used according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad). The IPG strips were hydrated overnight with samples containing 100 µg of proteins in preparation buffer and traces of bromophenol blue. Proteins were subjected to isoelectric focusing (PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad) for a total of 35 000 V.hrs. Prior to the second dimension, the IPG strips were incubated twice for 15 min in an equilibration buffer (6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8) containing 2% DTT as the first step, then replaced by 4% iodoacetamide as the second step. SDS-PAGE was performed with 12% gels using the buffer system of Laemmli (1970). The gels were run at 20 mA per gel for the first 30 min and then at 40 mA. The protein spots in analytical gels were visualized by silver staining (Blum et al. 1987). Preparative gels were stained with CBB G-250 (Lauriere et al. 1996).

Image and data analyses

The silver stained gels were scanned using a densitometer GS-800 (Bio-Rad). The wizard detection method proposed by the PDQuest 7.0.1 software (Bio-Rad) was used to detect the spots. The gels were automatically matched in order to attribute a common spot identity for the same spots derived from different images. Manual editing was carried out. The PDQuest software was used to construct a master gel (Fig. 3). For each sample, when a protein was detected in all the replicates, this protein was automatically added to the master gel. Spot abundance was normalized as a relative volume to compensate for differences in sample loading and gel staining, using the PDQuest software. The spots whose quantity varied

significantly after inclination were numbered (Marengo et al. 2005). Three gels using independent protein preparations were analysed for each condition. Statistical analyses were performed using the student's *t*-test ($p < 0.05$).

Protein identification by MALDI-TOF analysis

In CBB-stained gels, we looked for spots whose quantity varied significantly from control to treated silver-stained gels. Protein spots from preparative CBB-stained gels were manually excised using pipette tips. The spots where then destained with 100 µL of 25 m*M* NH_4HCO_3 and 5% v/v acetonitrile for 30 min, followed by 100 µL of 25 m*M* NH_4HCO_3 and 50% v/v acetonitrile and then dehydrated in acetonitrile. Gel spots were completely dried using a Speed Vac before trypsin digestion at 37°C over 5 h with 3 volumes of trypsin (10 ng/µL; V5111, Promega, Madison, WI).

For matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis, 1 µL of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/mL of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoro-acetic acid) was immediately added and allowed to dry at room temperature. Peptide masses were determined in positive-ion reflector mode in a Voyager DE-Pro model MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin, with protonated masses of 842.509, 1045.564, and 2211.104 Da.

Peptides mass fingerprints (PMF) were compared with specific *Populus* EST database (*Populus trichocarpa v1.0*, downloaded from http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html, containing 45555 entries) by using MASCOT v. 2.1 program [http://www.matrixscience.com).

Database searches were made using the following criteria: 1 missing trypsin cleavage site, partial methionine oxidation, partial carbamidomethylation of cysteine, and mass deviation lower than 30 ppm

Protein identification by LC-ion trap MS/MS analysis

HPLC was performed with an ultimate LC system combined with Famos autosample and Switchos II microcolumn switching for pre-concentration (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). The samples were loaded on a PEPMAP C18 column, 5 µm, 75 µm ID, 15 cm (LC Packings) using a pre-concentration step in a micro pre-column cartridge (300 µm ID, 1 mm). Six µL of the sample were loaded on the pre-column at 30 µL /min. After 3 min, the pre-column was connected with the separating column and the gradient was started at 200

nL /min. The buffers were 5% acetonitrile in water with 0.5% HCOOH (A) and 95% acetonitrile in water with 0.5% HCOOH (B). A linear gradient from 10 to 90% B for 45 min was applied. For ion trap MS, a LCQ deca with a nano electrospray interface (Thermofinnigan, Les Ulis, France) was used. Ionization (2 kV ionization potential) was performed with a liquid junction and a non-coated capillary probe (New Objective, Cambridge, MA, USA). Peptide ions were analyzed by the data-dependent "triple play" method: (i) full MS scan (m/z 400-1800), (ii) zoomscan (scan of the major ion with higher resolution), (iii) MS/MS of this ion. Identification of peptides was performed with SEQUEST or MASCOT, using the query settings "partial methionine oxidation and partial carbamidomethylation of cysteine" and "mass deviation lower than 1,5 Da and 0,8 Da for ions parents and fragments respectively", within *Populus* EST database [http://genome.jgi-psf.org].

The candidate database peptide with the highest score was retained if the following identification criteria were met: Xcorr (SEQUEST) of at least 2.0, 2.2 and 3.5 for singly, doubly and triply charged peptides respectively or probability based Mowse score (MASCOT) significant ($p<0.05$). This was confirmed by peptide manual validation after meeting the following criteria: (i) MS/MS spectrum was of good quality with fragment ions clearly above baseline noise, (ii) continuity to b or y ion series, (iii) N-terminal to proline y ions were intensive ions. This process allowed satisfactory peptide identification, so that when 2 or more valid peptides were obtained for one protein, the protein could be identified. When only one valid peptide was obtained, the protein was identified only if analysis of the sequence tag by PepNovo [http://proteomics.bioprojects.org/Software/PepNovo.html] gave the same protein (Waridel et al. 2007).

Histochemical analysis

Stem portions were fixed in a solution containing 3.7% v/v formaldehyde, 5% v/v acetic acid, 50% v/v ethanol, for 4 h at 4°C. The samples were then dehydrated and gradually infiltrated with medium grade L.R. White resin (Sigma Aldrich) with solutions of 25:75, 50:50, 75:25 (v/v) L.R. White resin: ethanol for 1 h each. Infiltration was completed in 100% L.R. White resin overnight at 4°C. The samples were then placed in gelatine embedding capsules, filled with fresh resin and heat polymerized at 55°C for at least 15 h, before semi-thin sectioning. The Periodic acid/ Schiff (PAS) reaction was used to detect starch and polysaccharides (Jensen 1962). Stained sections were dried, mounted in Eukitt and examined under Zeiss Axioplan 2 microscope. Data were recorded using a digital camera (AxioCam HR, Zeiss) with the AxioVision digital imaging software. In order to visualize the reaction wood which was generated by stem inclination, semi-thin sections were stained with astra blue and

safranine (Sigma). Astra blue stained tissues composed of pure cellulose, such as G fibers, while safranine stained lignins red. Observations were made as described above.

Recording of tree shape and curvature analysis

The shape of the inclined poplar tree was recorded immediately after inclination and 45 min, 1, 3, 5 and 7 days after inclination using a fine metallic strand to make a replica of the stem onto a sheet of paper. After scanning, the tree shape was digitized using ImageJ software version 1.38 (http://rsb.info.nih.gov/ij/). The field of curvature of each tree shape was computed using digitalized data (Coutand et al. 2007).

Results

Histochemical analyses of stem sections

In order to characterize the plant material used for proteomic studies, microscopical observations were made of stem sections from internodes 4 (basal part) and internodes 15 and 21 of stem inclined 45 min and one week respectively. Cross and longitudinal sections clearly showed the presence of starch grains only in parenchymatic cells localized in the cortex close to sclerenchyma. These amyloplasts sedimented onto the lower face of the cells (Fig. 1A, B). Dual staining with safranine and astra blue showed tension wood in the basal region of stems inclined for one week. This tension wood was limited to the upper face of the stem (Fig. 1C, D). On the lower face, the opposite wood fibers were produced at a slower rate, causing a pith eccentricity. No tension wood was observed in the top internodes even when the stem was inclined for as long as one week (data not shown).

Kinematics of the gravitropic response

A typical example of the changes of stem shape over time is given in Figure 2A. Reorientation became clearly visible in the stem apical region after inclination for 24 h. The top region nearly reached the vertical position one week after inclination. The gravitropic response was quantified using curvature fields (Fig. 2B) since this method makes it possible to visualize phases of the righting process (Coutand et al. 2007). The basal part of stems showed no significant deformation when inclined for 45 min or for one week. After 45 min inclination, the top part used for protein extraction bent slightly downward. When observed over one week, a change in curvature occurred in the apical region of the stem (Fig. 2A). Curvature first increased and progressed toward the base, but then it decreased to zero giving decurving of the trunk. The apical region used for extraction (one week of inclination) had nearly reached the vertical, and was in the autotropic phase (Coutand et al. 2007).

Overall changes in protein pattern

Using silver or CBB staining, 2D-PAGE patterns were revealed in a pI range between 4 and 7. More than 1300 protein spots were initially detected in each silver stained gel using Bio Rad PDQuest software. From this analysis, we generated two distinct master gels for 45 min and one week of inclination respectively. After manual editing, 285 and 336 distinct spots were monitored for the 45 min and one week conditions, respectively, of which about 40% were seen to undergo significant changes (Table 1 and Fig. 3).

Identification of differentially expressed proteins

All the spots, revealed by CBB staining, that were clearly distinct and differentially expressed were analyzed by mass spectrometry. Among the 135 spots analyzed, there were no clear data for 56 spots, and no matches (no hits) were found in databases for 19 other spots, while 60 spots were successfully identified; either by PMF or MS/MS analysis. The database search results are given in Table 2. The identified proteins were classified into functional categories using Gene Ontology annotations for *Populus trichocarpa* available at the Joint genome Institute [http://genome.jgi-psf.org/], and manual curation (Table 2). Some of these identified proteins were annotated either as unknown and hypothetical proteins or as proteins without specific function in the database. The relative distribution of identified proteins associated with these categories is presented in Figure 4. When an identified spot was differentially expressed before and after inclination ($p<0.05$), it is mentioned by an arrow in Table 2. The arrowhead pointing downwards or upwards indicates a decrease or an increase of the normalized quantity of the spot after inclination respectively. Supplementary data related to this table are also available.

Modifications of protein expression after 45 min of gravitational stimulation

Few identified spots showed qualitative changes. The SEC14 protein (spot 6), was not detected at the basal region of the stem, either in the control or in the inclined plant. SEC13 (spot 8202) and Elongation Factor 1 alpha subunit (EF1α – spot 2108) were not detected at the basal part of the stem after inclination. These proteins are indicated as decreasing at the base of the stem in Figure 5.

At the top and the basal regions of the stem, similar patterns of expression (i.e. increase or decrease after inclination) were observed for an unclassified protein (spot 7 noted as RNA recognition motif containing protein) which decreased, and for an isoform of ATP synthase (spot 51) which increased. Some proteins showed opposite patterns of expression between the top and the basal part of the stem after inclination. The expression of three proteins was increased by inclination at the top of the stem, and decreased at the base (Oxygen Evolving

Enhancer protein 2 (OEE2 – spot 7003), a translationally controlled tumor protein homolog (TCTP – spot 16) and EF1α (spot 2108). In contrast, the Oxygen Evolving Enhancer protein 1 (OEE1 – spot 3108) was decreased at the top and increased at the base of the inclined stem. Most proteins showed a modification of expression after inclination only in one part of the stem. Figure 5 is a synthetic representation of the modifications of expression pattern for the proteins identified.

Modifications of protein expression in stems inclined for one week

Similar patterns of expression were observed between the top and the basal stem for three spots. A chaperonin 60 beta like protein (spot 55) was up-regulated while a nucleosome assembly protein (spot 9) and tubulin alpha chain (spot 50) were down-regulated after inclination. Opposite patterns of expression between the top and the base were found for two spots (OEE1 spots 1 and 3108). As observed for the 45 min condition, most proteins identified were significantly differentially expressed after one week of inclination, either at the top or in the basal part of the stem (Fig. 6).

Discussion

Intracellular and intercellular events occurring in the stem after gravitropic stimulation are not well understood, especially in woody species. We undertook a global approach concerning modifications in protein expression in whole internodes, as a parallel to studies already made for herbaceous species (Moseyko et al. 2002, Centis-Aubay et al. 2003). We did not separate the upper side from the lower side of the organ since the entire section probably participates as a whole in perception of inclination. The young poplar stems used in our experiments showed amyloplasts only in parenchymatic cells from the cortex and not in the xylem. Since these cells could be the “sensing cells” of the gravistimulus and since young stems still display not fully differentiated tissues which are difficult to isolate, we chose to work with whole internodes instead of separating xylem from the other tissues. Young poplar stems show a preponderant primary growth in the top internodes and differential cambium activity in the basal internodes after inclination with some tension wood formed after one week. In addition, curvature fields which help the visualization of the righting process show that the apical part was largely modified between 45 min and one week of stimulation. Both series of observations highlighted different cytological and mechanical states of the stem between the conditions tested i.e. at the top and basal parts after 45 min or one week of inclination.

Based on these observations, it can be suggested that each part of the plant senses and responds differently to inclination. Signalling cascades leading to stem reorientation may be

different in primary or secondary tissues. Informative molecules possibly circulate through the plant to give a coordinated response to the stimulus. We chose to analyze modified protein expression both in the apical and basal regions of the stem to obtain an integrative understanding of the plant response to the stimulus. Sixty protein spots representing a large range of functional categories involved in multiple metabolisms, regulation and signal pathways were successfully identified. The patterns of protein expression differed between the conditions tested (apical, basal regions, 45 min and one week of inclination), underlining the importance of physical state and developmental stage of the organ in gravitropic responses.

Interestingly, the energetic pathway seems to be affected by gravitational stimulation. After 45 min of inclination**,** among the few proteins that were up-regulated both at the top and the base of the stem, we have found three spots corresponding to mitochondrial ATP synthase beta chain. This observation could be related to a possible high energy and metabolic activity demand for straightening of the stem. Similarly, genes coding for subunits of ATP synthase increased in their transcript abundance following gravitational stimulation of Arabidopsis root (Kimbrough et al. 2004). Alternatively to the energetic hypothesis, it has been postulated that the up-regulation of ATP synthase might be a response related to the detrimental effect caused by an oxidative stress in the synthesis of ATP, because ATP synthase catalyzes key phosphorylation reactions associated with aerobic catabolism (Requejo and Tena 2005). These last years, the involvement of oxidative burst plant defence genes in the gravitropic response has been evoked (Joo et al. 2001, Moseyko et al. 2002). The implication of ROS (Reactive Oxygen Species) in response to 45 min of inclination is consistent with the fact that we observed a down-regulation of the cytosolic CuZn Superoxide Dismutase (CuZn SOD) at the top of the stem. SOD has been shown elsewhere to be down-regulated by various oxidative stresses (Sweetlove et al. 2002). Furthermore, after 45 min of gravistimulation, at the top of the stem, the increase observed in accumulation of the large subunit of RUBISCO, showing a low experimental mass compared to the theoretical protein mass, could indicate greater rates of protein degradation. There is evidence that large RUBISCO subunits can be cleaved by ROS generated at the metal-binding site (Luo et al. 2002). In addition, down-regulation of a chlorophyll A-B binding protein and of the nuclear encoded protein OEE1 (Oxygen Evolving Enhancer protein 1 which is bound to photosystem II) might also be interpreted as a response to oxidative stress caused by inclination. It has been shown that deviation from regular redox homeostasis can be sensed in chloroplasts and that specific chloroplast signals control nuclear gene expression (for review see Baier and Dietz 2005). The decrease in OEE1 and in chlorophyll A-B binding protein could be a consequence of such signalling and thus would impair

oxygen evolving activity and photosystem II stability (Sugihara et al. 2000). In turn, this could avoid the absorption of an excess of light energy in already oxidant conditions.
Of interest too is the up-regulation of actin at the top of the stem after 45 min inclination. Although an intact actin microfilament network does not seem to be required for gravisensing in stems (Yamamoto and Kiss 2002), recent studies showed the importance of cell wall-plasma membrane-cytoskeleton structural continuum, and essentially of actin microfilaments, for a proper functioning of plant cells (Wojtaszek et al. 2007). The putative displacement of amyloplasts found along the young poplar stem may modify this continuum, and trigger signalling cascades (Perera et al. 2006). Our proteomic data do not show directly the implication of microtubules in the top part of the inclined stem. However, at the top of inclined stem after 45 min, the regulation of proteins such as the translationally controlled tumour protein (TCTP) and elongation factor 1-alpha (EF1α) could be related to these elements. TCTP is a highly conserved protein expressed in all eukaryotic organisms, defined as a cytoplasmic Ca^{2+}- and microtubule binding protein (Durso and Cyr 1994). Regarding EF1α, it is worth noting that it was also up-regulated by gravitational stimulation in Arabidopsis roots (Kamada et al. 2005). Aside from its role in protein synthesis, EF1α was proposed to be involved in lateral association with microtubules within higher plant cells. A Ca^{2+}/calmoduline pathway was shown to be involved in this association (Durso and Cyr 1994). Although still controversial, Ca^{2+} has already been proposed to link gravity sensing to differential growth response (Plieth and Trewavas, 2002; Morita and Tasaka, 2004). In our study we found that calreticulin, a Golgi and ER localized Ca^{2+}-storage protein (Pagny et al. 2000), was down-regulated in inclined stems. It suggests that modulation of calcium-signalling does occur. Inositol 1,4,5-triphosphate might also be involved in gravity sensing (Perera et al. 2006). In agreement with this hypothesis, we observed in our experiments that SEC14, a protein showing homologies with a prokaryotic Phosphatidyl-Inositol transfer protein (SEC14p) was down-regulated after inclination. SEC14p orthologs have been identified in eukaryotes where they do function as phosphoinositide signalling intermediates (Routt and Bankaitis 2004).

At 45 min of gravistimulation, four proteins (namely OEE1, OEE2, EF1α and TCTP) of the 11 found differentially expressed at the base of the stem show opposite patterns of regulation (highlighted proteins). This suggests that these proteins are involved in the same signalling pathways. The opposite patterns of expression could be due to differences of deformation between the top and the base of the stem. After inclination, the top bent downward whereas the basal part exhibited almost no curvature. In addition, the apical region showed a preponderant primary growth, while the basal region showed a preponderant secondary growth. Both the different mechanical state and the different type of growth of these two

regions might induce opposite patterns of regulation. Further studies are necessary to sustain this hypothesis, such as the cellular localization of these proteins.
In contrast to the situation observed in the apical region at 45 min, at the base we found two proteins which could be involved in wood development. Phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER), an enzyme involved in lignan synthesis, was up-regulated. PCBER has been shown to be preferentially produced in the secondary xylem of stems and roots and is associated with the active growth period (Vander Mijnsbrugge et al. 2000a). PCBER synthesis was observed in xylem, bark and pith of mechanically bent poplar stems by Vander Mijnsbrugge et al (2000b) who suggested a role for PCBER in wood development. The apical up-regulation recorded of S-adenosylmethionine synthase (SAMs), an enzyme involved in lignin formation (Moffatt and Weretilnyk 2001, Plomion et al. 2006), could be another signal, along with PCBER up-regulation, that opposite or tension wood formation occurried in our stressed plants.

After one week of inclination, the top of the stem had almost reached the vertical, but the process of decurving, referred as the autotropic phase (Coutand et al. 2007) was still ongoing. Our data showed an implication of ROS signalling in the decurving process since Glutathione-dehydroascorbate reductase (GSH-DHAR), glutathione S-transferase (GST) and thioredoxin h were up-regulated, while CuZn SOD was down-regulated. At this stage of our study, without precise information regarding the cellular localization of these different ROS primary or secondary scavengers, it is difficult to understand what is happening. It was however not surprising that ROS could participate in gravitational stress signal integration, since ROS in plants act as regular signal transducers in various processes (Foyer and Noctor 2005). The finding that pyruvate dehydrogenase (E1), and triose-P isomerase were up-regulated after one week inclination at the top of the stem, merits some attention. Involvement of such enzymes suggests that there are some changes in carbohydrate requirements (Tovar-Méndez et al. 2003, Dorion et al. 2005). Observations that some proteins are first up-regulated at the base of the stem at 45 min and then up-regulated at the top of the stem after one week (for example SAMs, Triose-P isomerase, OEE1 and ATP synthase) suggest a community of signalling cascades that may take place both in early curving and late decurving processes. Finally, it should be noted that several chaperones (copper chaperone and chaperonin 60 β) were found up-regulated after one week of inclination at the base of the stem. This does not come as a surprise because chaperones, by their effects in protein folding and protein trafficking, are intermediates in multiple transduction pathways (Kimura et al. 1995, Tsai and Douglas 1996).

As a conclusion, different metabolisms and signalling pathways appear to be involved in each region of the stem following 45 min or one week of inclination. This suggests that primary and secondary tissues present specific mechanisms to sense reorientation and to respond to inclination. In primary growth, the gravitropic curvature results from differential cell elongation on opposite sides of the tilted organ, while the gravitropic response includes the formation of reaction wood in the case of parts exhibiting secondary growth. This indicates opposite regulations of some proteins such as OEE1 and OEE2 between the apical and basal regions of the stem. Additional studies will be necessary to ascribe a more detailed role to these proteins after gravitational stress. Most of the proteins which were regulated following inclination were also involved in response to other biotic or abiotic stresses. This is in accordance with the hypothesis of the existence of a sensory network for the perception of numerous environmental signals including gravitropic, thigmomorphic, self loading, growth strains, turgor pressure, xylem pressure potential and sound (Telewski 2006). How plants distinguish between the different stimuli to select the appropriate response is still unknown.

Acknowledgements

This work was supported by the Commissariat du Massif Central, the ANR “Woodiversity” (Agence Nationale de la Recherche, France) and the University of Tunis (Tunisia). DoE Joint Genome Institute and Poplar Genome Consortium are acknowledged. We thank Sylvaine Labernia and Christelle Boisselet for their technical help. We are indebted to Dr Gérard Branlard (INRA, Clermont-Ferrand, France) for his advice on proteomics and to Pr JR Drevet (UBP, Clermont-Ferrand) for critical reading of the manuscript. We thank Dr Felicity Vear (INRA, Clermont-Ferrand, France) for English grammar and syntax corrections.

References

Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall byosynthesis. Plant J 45: 144-165

Baier M, Dietz K-J (2005) Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: A discussion on chloroplast redox signals in context of plant physiology. J Exp Bot 56: 1449 – 1462

Barlow PW (1995) Gravity perception in plants: a multiplicity of systems derived by evolution? Plant Cell Environ 18: 951-962

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. Plant Physiol 133: 1667–1690

Blum H, Beier H, Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99

Centis-Aubay S, Gasset G, Mazars C, Ranjeva R, Graziana A (2003) Changes in gravitational forces induce modifications of gene expression in *A. thaliana* seedlings. Planta 218: 179-185

Chang SC, Cho MH, Kim SK, Lee JS, Kirakosyan A, Kaufman PB (2003) Changes in phosphorylation of 50 and 53 kDa soluble proteins in graviresponding oat (*Avena sativa*) shoots. J Exp Bot 54: 1013-1022

Cholodny N (1927) Wuchshormone und tropismen bie den pflanzen. Biol. Zbl. 47: 604-629.

Cosgrove DJ (1997) Cellular mechanism underlying growth asymmetry during stem gravitropism. Planta 203: 130-135

Coutand C, Fournier M, Moulia B (2007) The Gravitropic Response of Poplar Trunks: Key Roles of Prestressed Wood Regulation and the Relative Kinetics of Cambial Growth versus Wood Maturation. Plant Physiol 144: 1166-1180

Dorion S, Parveen Jeukens J, Matton DP, Rivoal J (2005) Cloning and characterization of a cytosolic isoform of triosephosphate isomerase developmentally regulated in potato leaves. Plant Sci 168: 183-194

Durso NA, Cyr RJ (1994) A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor -1α. Plant Cell 6: 893-905

Firn J, Digby RD (1985) The gravitropic set-point angle (GSA): the identification of an important developmentally controlled variable governing plant architecture. Plant Cell Environ 18: 1434-1440

Fournier M, Baillères H, Chanson B (1994) Tree biomechanics: growth, cumulative prestresses and re-orientations. Biomimetics 2: 229-251

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell 17: 1866–1875.

Harrison BR, Masson PH (2008) ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. Plant J 53: 380-392

Herbette S, Brunel N, Prensier G, Julien JL, Drevet JR, Drevet PR. (2004) Immunolocalization of a plant glutathione peroxidase-like protein. Planta 219: 784-789.

Jensen WA. (1962) Botanical Histochemistry. Principles and practice. Freeman WH (ed) San Francisco and London.

Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. Plant Physiol 126: 1055–1060

Kamada M, Higashitani A, Ishioka N (2005) Proteomic analysis of *Arabidopsis* root gravitropism. Biol Sci Space 19: 148-154

Kimbrough JM, Salinas-Mondragon R, Boss WF, Brown CS, Sederoff HW (2004) The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. Plant Physiol 136: 2790-2805

Kimura Y, Yahara I, Lindquist S (1995) Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways. Science 268: 1362–1365

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature 227: 680-685

Lauriere M, Bouchez I, Doyen C, Eynard L (1996) Identification of glycosylated forms of wheat storage proteins using two-dimensional electrophoresis and blotting, Electrophoresis 17: 497–501

Luo S, Ishida H, Makino A, Mae T (2002) Fe^{2+}-catalyzed site-specific cleavage of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. J Biol Chem 277: 12382–12387

Marengo E, Robotti E, Antonucci F, Cecconi D, Campostrini N, Righetti PG (2005) Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. Proteomics 5: 654-666

Moffatt BA, Weretilnyk EA (2001) Sustaining S-adenosyl-Lmethionine- dependent methyltransferase activity in plant cells. Physiol Plant 113: 435–442

Morita MT, Tasaka M (2004) Gravity sensing and signalling. Curr Opin Plant Biol 7: 1-7

Moseyko N, Zhu T, Chang HS, Wang X, Feldman LJ (2002) Transcription profiling of the early gravitropic response in *Arabidopsis* using high-density of oligonucleotide probe microarrays. Plant Physiol 130: 720-728

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-492

Pagny S, Cabanes-Macheteau M, Gillikin JW, Leborgne-Castel N, Lerouge P, Boston RS, Faye L, Gomord V (2000) Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. Plant Cell 12: 739–355

Perera IY, Hung C, Brady S, Muday GK, Boss WF (2006) A Universal Role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated Signalling in Plant Gravitropism. Plant Physiol 140: 746-760

Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiol 129: 786–796

Plomion C, Lalanne C, Claverol S, Meddour H, Kohler A, Bogeat-Triboulot M-B, Barre A, Le Provost G, Dumazet H, Jacob D, Bastien C, Dreyer E, de Daruvar A, Guehl J-M, Schmitter J-M, Martin F, Bonneu M (2006) Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. Proteomics 6: 6509-6527

Ramagli LS, Rodriguez LV (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Electrophoresis 6: 559-563

Requejo R, Tena M (2005) Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. Phytochemistry 66: 1519-1528

Routt SM, Bankaitis VA (2004) Biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins. Biochem Cell Biol 82: 254-262

Schnabl H (2002) Gravistimulated effects in plants. In: Horneck G, Baumstark-Khan C (eds) Astrobiology. The quest for the conditions of life, Physics and astronomy online library, Springer, Berlin, pp 297-313

Sugihara K, Hanagata N, Dubinsky Z, Baba S, Karube I (2000) Molecular Characterization of cDNA Encoding Oxygen Evolving Enhancer Protein 1 increased by Salt Treatment in the Mangrove *Bruguiera gymnorrhiza.* Plant Cell Physiol 41: 1279-1285

Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ, Millar AH (2002) The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. Plant J 32: 891–904

Telewski F (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. Am J Bot 93: 1466-1476.

Tovar-Méndez A, Miernyk JA, Randall DD (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. Eur J Biochem 270: 1043-1049

Tsai J, Douglas MG (1996) A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for *YDJ1* stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. J Biol Chem 271: 9347–9354

Vander Mijnsbrugge KV, Beeckman H, De Rycke R, Montagu MV, Engler G, Wout B (2000b) Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. Planta 211: 502-509

Vander Mijnsbrugge KV, Meyermans H, Montagu MV, Bauw G, Boerjan W (2000a) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. Planta 210: 589-598

Waridel P, Frank A, Thomas H, Surendranath V, Sunyaev S, Pevzner P, Shevchenko A (2007) Sequence similarity-driven proteomics in organisms with unknown genomes by LC-MS/MS and automated de novo sequencing. Proteomics 7: 2318–2329

Went FAFC (1933) Die bedeutung des wuchsstoffs fur wachstum, photo-und geotropische krummung. Naturwissenschaften 21: 1-7

Wojtaszek P, Baluska F, Kasprowicz A, Luckzak M, Volkmann D (2007) Domain-specific mechanosensory transmission of osmotic and enzymatic cell wall disturbances to the actin cytoskeleton. Protoplasma 230: 217-230

Yamamoto K, Kiss JZ (2002) Disruption of the Actin Cytoskeleton Results in the Promotion of Gravitropism in Inflorescence Stems and Hypocotyls of Arabidopsis. Plant Physiol 128: 669-681

Supplementary material

	45 min						one week					
	top			base			top			base		
Spot	inclined (I)	control (C)	ratio I/C	inclined	control	ratio I/C	inclined	control	ratio I/C	inclined	control	ratio I/C
4412	24895,57	11297,20	2,20	15579,19	16049,58	0,97	5188,24	10594,56	0,49	3652,30	6253,18	0,58
49	–	–	–	–	–	–	4575,98	5364,20	0,85	2048,34	886,19	2,31
50	–	–	–	–	–	–	1190,80	2737,22	0,44	1616,02	3318,90	0,49
48	–	–	–	–	–	–	561,68	2140,90	0,26	95,32	84,99	1,12
36	2361,63	2067,62	1,14	2113,01	2426,44	0,87	856,46	1683,00	0,51	516,03	535,40	0,96
24	5929,91	4500,92	1,32	6202,17	9452,92	0,66	2943,56	3833,88	0,77	2478,32	1376,48	1,80
3220	1901,45	2707,36	0,70	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3312	10309,98	7164,21	1,44	12241,79	4423,91	2,77	–	–	–	–	–	–
4315	33044,68	19774,89	1,67	35992,01	29247,71	1,23	–	–	–	–	–	–
12	1307,39	2578,21	0,51	269,67	150,49	1,79	493,82	977,76	0,51	406,98	326,44	1,25
6208	14437,36	14926,86	0,97	21629,17	12749,78	1,70	9202,00	7428,59	1,24	10065,60	7507,98	1,34
7521	6774,84	4789,63	1,41	8262,20	6143,11	1,34	6145,37	2538,18	2,42	1447,43	1402,81	1,03
7512	7379,51	6122,90	1,21	7669,98	2965,26	2,59	2594,25	1378,40	1,88	1238,90	922,59	1,34
46	3376,56	3910,54	0,86	2098,18	1433,28	1,46	1357,32	880,80	1,54	1158,05	979,78	1,18
5108	3474,04	4864,60	0,71	1865,31	1259,31	1,48	1722,56	1239,83	1,39	935,29	910,96	1,03
30	–	–	–	–	–	–	2177,69	783,52	2,78	1364,49	1319,51	1,03
13	17653,72	15000,72	1,18	5302,54	4399,38	1,21	3113,42	2588,08	1,20	593,65	896,55	0,66
8209	11795,36	10030,92	1,18	3581,23	2988,80	1,20	3113,42	2588,08	1,20	234,77	896,55	0,26
32	4874,31	6338,07	0,77	767,41	785,93	0,98	4086,83	2493,22	1,64	939,29	765,22	1,23
7011	9346,77	9058,72	1,03	7814,42	9539,40	0,82	5130,28	9384,67	0,55	5771,49	6445,57	0,90
7002	308,37	850,71	0,36	2576,72	2786,31	0,92	–	–	–	–	–	–
8002	6397,24	4633,04	1,38	4966,60	4420,37	1,12	3748,59	2064,30	1,82	1660,15	2415,24	0,69
3007	3399,26	2981,14	1,14	3356,62	2907,93	1,15	3920,23	3783,79	1,04	1262,14	857,39	1,47
7003	2676,19	93,56	28,60	128,07	8489,37	0,02	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	4153,74	2201,60	1,89	1091,11	976,06	1,12
1	11076,10	9828,82	1,13	12265,53	5740,20	2,14	10784,76	5514,16	1,96	2762,86	8247,15	0,34
3108	11609,80	14647,01	0,79	6218,42	2319,71	2,68	6120,54	4544,04	1,35	2458,56	3629,94	0,68
2015	1424,29	2598,37	0,55	2556,26	2155,52	1,19	784,06	1076,77	0,73	1396,24	1170,61	1,19
4002	3065,70	378,57	8,10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
51	14789,11	4684,57	3,16	14043,64	8631,65	1,63	7764,39	4206,89	1,85	3991,89	3305,70	1,21
4524	9473,33	2690,28	3,52	4147,45	4089,94	1,01	3220,70	1936,66	1,66	1327,52	1942,97	0,68
3521	8145,68	1784,09	4,57	3660,34	2632,94	1,39	4532,52	1729,05	2,62	1341,29	1316,53	1,02
5003	144,61	777,61	0,19	128,07	150,49	0,85	–	–	–	–	–	–
55	–	–	–	–	–	–	2244,270	821,260	2,733	512,910	268,190	1,912
5008	2732,00	3182,66	0,86	3084,85	2948,47	1,05	2499,81	3768,74	0,66	1853,00	883,36	2,10
21	–	–	–	–	–	–	1632,30	2303,77	0,71	815,88	635,30	1,28
5007	5628,10	2585,89	2,18	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	1958,12	5531,84	0,35	19461,80	12996,17	1,50	10969,23	12329,83	0,89	1312,41	2704,02	0,49
44	–	–	–	–	–	–	244,660	166,570	1,469	1404,440	2704,020	0,519
9	1083,44	4254,80	0,25	4040,68	5651,45	0,71	3459,81	5318,65	0,65	1033,26	3462,62	0,30
5011	101,44	350,97	0,29	89,56	111,83	0,80	55,00	64,29	0,86	409,71	67,73	6,05

39	–	–	–	–	–	–	4400,78	5791,05	**0,76**	5724,86	2842,31	**2,01**
2108	12143,80	8122,35	**1,50**	abs	10071,12	**C****	–	–	–	–	–	–
23	20654,77	8564,85	**2,41**	10690,73	9342,09	**1,14**	9945,44	7762,25	**1,28**	2802,84	72,41	**38,71**
33	1829,03	1674,93	**1,09**	1132,05	475,02	**2,38**	1300,70	5660,29	**0,23**	abs	abs	**abs**
10	11432,89	5913,20	**1,93**	8323,93	9302,00	**0,89**	2516,89	3943,13	**0,64**	3131,17	1994,72	**1,57**
8202	2211,51	3036,49	**0,73**	abs	328,80	**C****	1106,65	291,50	**3,80**	337,37	288,84	**1,17**
6	900,27	1146,46	**0,79**	abs	abs	**abs**	1559,24	1425,37	**1,09**	252,18	265,77	**0,95**
6102	4045,78	3836,69	**1,05**	1304,05	1012,99	**1,29**						
207	3043,98	3915,26	**0,78**	2677,68	2004,90	**1,34**	–	–	–	–	–	–
7	101,44	350,97	**0,29**	580,44	2044,00	**0,28**	2777,60	1691,69	**1,64**	5788,71	2077,18	**2,79**
53	–	–	–	–	–	–	55,00	64,29	**0,86**	409,71	67,73	**6,05**
16	5024,58	1332,09	**3,77**	3353,52	10195,78	**0,33**	1545,490	1064,000	**1,453**	447,630	622,280	**0,719**
5006	6132,79	2674,39	**2,29**	–	–	–	4852,58	6132,00	**0,79**	1736,14	1525,34	**1,14**
28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	35159,88	15073,67	**2,33**	45330,63	41684,29	**1,09**	1110,265	837,378	**1,326**	1011,817	465,937	**2,172**
40	–	–	–	–	–	–	55,00	4824,45	**0,01**	12473,05	16182,88	**0,77**
6004	9167,24	5565,23	**1,65**	16173,78	20332,79	**0,80**	45,63	5434,32	**0,01**	5756,95	4477,33	**1,29**
6003	5606,01	4877,93	**1,15**	4116,25	5569,78	**0,74**	–	–	–	–	–	–
6006	647,54	504,08	**1,28**	907,31	467,80	**1,94**	3145,31	8605,33	**0,37**	4426,88	3935,44	**1,12**
							5023,08	1188,12	**4,23**	1159,88	895,73	**1,29**

Appendix S1: Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry.

The proteins were extracted from the top or the base of the stem that were inclined 35° from the vertical axe for 45 min or one week (see Material and methods section).
First column: Assigned spot number as indicated in the accompanying paper.
– indicates that the spot was present but was not quantified either in the control or inclined condition, (abs) the spot was absent both in control and inclined conditions, (C**) the spot was present in the control but not detected after inclination.
The means of normalized quantities was calculated from three replicas for spots from the control (C) and inclined (I) conditions, and statistical analyzes were performed ($p < 0.05$ student test). When the difference between the means of the normalized quantities from the inclined and control conditions was significant, the ratio I/C is indicated in red.

Appendix S3:

Appendix S3: Results of the PepNovo and MSBlast procedures to validate hits produced by MASCOT searches.
The procedure was initially described by Waridel et al (2007). It was used here to validate the results from the MASCOT searches which gave only one peptid per spot.Using PepNovo software [http://proteomics.bioprojects.org/Software/PepNovo.html] other sequence tags were obtained. Only tags obtained with a score higher than 75 were considered. These sequences were submitted to MS-BLAST [http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html] to confirm validation. Since isobaric oxidized methionine and phenylalanine residues were not distinguished in ion trap spectra, both candidate sequences were included into the query string for MS BLAST search. All MASCOT results were validated since the same hit was obtained after PepNovo/MS-BLAST procedures (yellow highlighted). The MS-BLASTscores obtained for the highlighted peptides are presented as well as the total score obtained after interrogation of databank with all sequence tags. For some proteins (28, 6003 and 6006), no match was found in the nrdatabase, although JGI interrogations [http://genome.jgi-psf.org] gave positive results and led to protein identification.

spot	MASCOT search	PepNovo sequencing /score	MS BLAST scores	MS BLAST total score
13	IVQGLSIDEFSR	LSDLDSLLAEVK/ 105		
		LVQGLSLDEFSR / 102	88 (84% Identity, 100% Positives)	151
		LSVQVSDVK / 76		
7002	AVAVLNSSEGVK	MEQEAMGRVDLFGGDR / 92		
		AVLNSSEGVK / 87	72 (100% Identity, 100% Positives)	105
		GGDNDM+16THLNLNGHNR / 82		
4002	DTNILAAFR	CPDLDSLLAEVK / 101		
		DTDLLAAM+16R / 72		113
		DTDLLAAFR / 71	61 (75% Identity, 83% Positives)	
28	LPLVTIFTR	PDNM+16GNTLDNDLMPEK / 92		
		GCTRTNGNTLDQTLMPTR / 87		
		LPLVTLM+16TR / 83	no match	no match
10	NTALNHYAAGYGR	HAAQLLLEAGATVDALDELK / 132		
		NTALHYAAGYGR / 104	175 (86% Identity, 90% Positives)	175
		YANNLAGCLEGNEQFLNAAK / 79		
207	GFGFVTFGNEK	GFGFVTM+16GNEK / 97	72 (76% Identity, 84% Positives)	
		GM+16VTFGNEK / 87		72
		GM+16VTM+16NNEK / 85		
6003	VAGAAEDLLEAASK	VAGAAEDLLEAASK / 115	no match	no match
6006	VAGAAEDLLEAASK	VAGAAEDLLEAASK / 120	no match	no match
		QWNQM+16ASM+16LDK / 84		
		THGDRPNCGLELLSGTK / 81		

	45 min		1 week	
	Top	**Base**	**Top**	**Base**
Decreased	59	55	48	59
Increased	39	60	107	55
Unchanged	187	170	181	222
Sum	285	285	336	336

Table 1: Alteration of protein expression in poplar stems after 45 min or 1 week of inclination. Proteins were extracted from the top or the base of the stems and submitted to 2D-PAGE and silver staining. When the mean normalized quantities of spots varied significantly between control and inclined conditions, spots are counted in the "decreased" or "increased" category. The other spots were noted "unchanged".

Spot [a] / Category	Definition line (on detailed poplar annotation and manual curation)	Assigned name[b]	Method	Score[c]	Peptides matched[d]	% Coverage[e]	Exp. pI/*Mr* [f]	Theor. pI/*Mr* [g]	45 min		1 week	
									Top	Base	Top	Base
Cytoskeleton organisation and biogenesis												
4412	Actin 3	estExt_Genewise1_v1.C_1850029	MS/MS*	1063	16	61	5.5/50.0	5.3/41.7	↑	ns	↓	ns
49	Tubulin alpha-5 chain	gw1.IX.2621.1	Maldi-Tof	97	10	33	5.2/50.5	5.0/48.9	–	–	ns	↑
50	Tubulin alpha-5 chain	gw1.IX.2621.1	Maldi-Tof	84	7	23	5.3/50.5	5.0/48.9	–	–	↓	↓
48	Beta tubulin	gw1.IX.3151.1	Maldi-Tof	120	14	31	5.0/60.3	4.8/49.4	–	–	↓	ns
Nucleotide metabolism												
36	Nucleoside-diphosphate kinase 1 (EC 2.7.4.6)	eugene3.00400106	MS/MS	121	2	13	6.4/14.4	6.0/16.3	ns	ns	↓	ns
24	Nucleoside-diphosphate kinase 1 (EC 2.7.4.6)	gw1.II.1445.1	MS/MS*	204	4	26	6.6/14.7	5.7/18.1	ns	↓	ns	↑
3220	Adenosine kinase	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VIII1052	MS/MS	103	2	7	5.2/44.7	5.0/37.3	ns	–	–	–
Lipid metabolism process												
3312	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	eugene3.01210029	MS/MS	333	5	15	5.5/50.1	5.1/42.3	ns	↑	–	–
4315	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	eugene3.01210029	MS/MS	257	4	14	5.4/50.6	5.1/42.3	↑	ns	–	–
Lignification												
12	Isoflavone reductase homolog (EC 1.3.1.-)	eugene3.00090496	MS/MS	101	2	7	5.9/41.6	6.0/33.7	↓	ns	↓	ns
6208	Phenylcoumaran benzylic ether reductase 7 (EC 1.3.1.-)	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_II0164	MS/MS	156	3	16	6.0/43.5	5.9/33.9	ns	↑	ns	↑
7521	S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6)	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XIV0257	Maldi-Tof	88	10	38	6.0/57.1	5.6/43.1	ns	ns	↑	ns
7512	S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6)	grail3.0050014702	Maldi-Tof	78	9	34	5.9/57.1	5.6/43.1	ns	↑	ns	ns
Carbohydrate metabolism and one-carbon compound metabolic process												
46	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0988	Maldi-Tof	78	8	42	5.1/29.9	5.0/27.3	ns	ns	↑	ns
5108	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX1362	Maldi-Tof	97	9	40	5.4/30.6	6.4/33.7	ns	↑	ns	ns
30	Pyruvate dehydrogenase E1 Beta subunit isoforme 1 (EC 1.2.4.1)	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I0194	Maldi-Tof	68	5	18	5.5/41.6	5.9/38.6	–	–	↑	ns
13	Malate dehydrogenase, NAD-dependent (EC 1.1.1.37)	eugene3.00081537	MS/MS	68	1	3	6.4/45.7	6.1/35.7	ns	ns	ns	↓
8209	Malate dehydrogenase, NAD-dependent (EC 1.1.1.37)	eugene3.00081537	MS/MS	315	6	27	6.4/45.7	6.1/35.7	ns	ns	ns	↓
Oxidative metabolism and detoxication												
32	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1 (EC 1.8.5.1)	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_X0841	Maldi-Tof*	62	6	39	6.1/28.8	5.8/23.6	ns	ns	↑	ns
7011	CuZn-superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	eugene3.00700152	MS/MS*	87	2	17	6.0/15.7	5.6/15.3	ns	ns	↓	ns
7002	CuZn-superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1233	MS/MS	73	1	7	5.8/18.0	5.4/15.2	↓	ns	–	–
8002	Gluthatione s-transferase (EC 2.5.1.18)	eugene3.00020134	MS/MS	237	6	24	6.4/28.4	6.3/24.3	ns	ns	↑	ns
3007	Thioredoxin h	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1461	MS/MS	128	4	36	5.1/13.1	5.6/12.6	ns	ns	ns	↑
Photosynthesis												
7003	Oxygen Evolving Enhancer 2	estExt_fgenesh4_kg.C_LG_XIII0043	MS/MS*	301	4	39	5.8/21.2	5.3/17.4	↑	↓	–	–
15	Oxygen Evolving Enhancer 2	eugene3.00020518	MS/MS	153	4	16	6.3/26.3	7.7/28.1	–	–	ns	ns
1	Oxygen Evolving Enhancer 1	estExt_fgenesh4_kg.C_LG_VII0034	Maldi-Tof*	62	7	28	5.4/33.8	5.8/35.1	ns	↑	↑	↓
3108	Oxygen Evolving Enhancer 1	estExt_Genewise1_v1.C_LG_V3745	MS/MS	411	9	32	5.3/34.5	5.8/35.1	↓	↑	↑	↓
2015	Chlorophyll A/B binding protein precursor	estExt_Genewise1_v1.C_LG_II0002	MS/MS	142	2	9	5.1/30.1	5.2/28.2	↓	ns	ns	ns
4002	RuBisCO large subunit (EC 4.1.1.39)	gw1.XIII.3028.1	MS/MS	38	1	16	5.2/20.9	6.1/60.4	↑	–	–	–
Primary metabolism (energy)												
51	ATP synthase, beta subunit (EC 3.6.3.14)	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1053	Maldi-Tof	132	15	42	5.5/60.3	6.0/59.8	↑	↑	↑	ns
4524	ATP synthase, beta subunit (EC 3.6.3.14)	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1053	MS/MS	744	12	27	5.4/60.3	5.9/59.9	↑	ns	↑	ns
3521	ATP synthase, beta subunit (EC 3.6.3.14)	Gw1.XIII.3025.1	MS/MS	97	2	3	5.3/61.4	5.1/54.0	↑	ns	↑	ns
5003	F1F0-type ATP synthase (EC 3.6.1.3)	grail3.0022036601	Maldi-Tof	116	10	53	5.4/21.5	5.2/19.6	↓	ns	–	–

Spot [a] / Category	Definition line (on detailed poplar annotation and manual curation)	Assigned name[b]	Method	Score[c]	Peptides matched[d]	% Coverage[e]	Exp. pI/*Mr* [f]	Theor. pI/*Mr* [g]	45 min		1 week	
									Top	Base	Top	Base
Genetic information processing												
55	Chaperonin, Cpn60/Hsp60p (3.6.4.9)	fgenesh4_pm.C_LG_I000009	MS/MS	218	3	5	5.3/71.1	5.6/64.2	−	−	↑	↑
5008	Copper chaperone	Gw1.X.3496.1	MS/MS	143	2	36	5.7/12.6	6.4/7.7	ns	ns	ns	↑
21	Molecular chaperones HSP70 superfamily	estExt_fgenesh4_pg.C_1500058	Maldi-Tof*	90	14	25	5.0/75.8	5.2/75.3	−	−	ns	ns
5007	HSP90 co-chaperone p23	grail3.0003052802	MS/MS	113	2	18	5.4/15.7	5.2/14.0	↑	−	−	−
8	Calreticulin 1	fgenesh4_pm.C_scaffold_133000042	Maldi-Tof*	68	7	18	4.6/63.0	4.6/43.8	↓	ns	ns	↓
44	Calreticulin 1	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII0635	Maldi-Tof	100	8	27	4.5/63.0	4.3/47.4	−	−	ns	↓
9	Nucleosome assembly protein	fgenesh4_pg.C_scaffold_145000035	MS/MS	199	5	12	4.6/64.5	4.3/43.9	↓	ns	↓	↓
5011	40S ribosomal protein S12	eugene3.00020526	MS/MS	100	2	18	5.6/16.6	5.5/15.3	↓	ns	ns	↑
39	60s acidic ribosomal protein P2B	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0111	MS/MS*	164	2	30	4.5/14.4	4.4/11.3	−	−	ns	↑
2108	Elongation factor 1-alpha	eugene3.00091463	MS/MS	54	2	8	4.8/31.6	4.6/24.4	↑	C**	−	−
23	Midasin-related protein	gw1.III.1966.1	Maldi-Tof*	64	4	45	4.7/33.1	4.8/13.6	↑	ns	ns	↑
Unclassified												
33	Bet v I allergen,	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VIII0155	Maldi-Tof*	28	4	26	6.0/15.7	6.0/17.0	ns	↑	↓	abs
10	Ankyrin-repeat HBP1 protein	gw1.66.739.1	MS/MS	77	1	3	4.8/44.0	4.4/33.5	↑	ns	↓	ns
8202	SEC13 protein	gw1.VIII.2915.1	Maldi-Tof*	48	5	15	6.1/38.5	5.6/32.6	ns	C**	↑	ns
6	Phosphatidylinositol transfer protein SEC14	gw1.III.1524.1	MS/MS	65	2	8	5.2/30.0	5.0/21.1	↓	abs	ns	ns
6102	Predicted dehydrogenase	eugene3.00060732	Maldi-Tof	106	9	48	5.6/31.6	5.6/27.0	ns	↑	−	−
207	RNA recognition motif containing protein	gw1.IX.1795.1	MS/MS	64	1	8	4.2/41.8	5.1/12.9	ns	ns	↑	↑
7	RNA recognition motif containing protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0527	Maldi-Tof*	79	7	52	5.7/14.8	5.5/16.5	↓	↓	ns	↑
53	Alpha-1,4-glucan-protein synthase (EC 2.4.1.)	grail3.0155001302	Maldi-Tof	96	11	32	6.0/49.4	5.8/41.2	−	−	ns	ns
16	Translationally controlled tumor protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3955	Maldi-Tof*	66	7	51	4.7/25.7	4.5/19.0	↑	↓	ns	ns
5006	RNA recognition motif containing protein	gw1.IX.1795.1	MS/MS*	98	2	16	5.5/16.5	5.1/12.9	↑	−	−	−
28	Unknown protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4753	MS/MS	39	1	27	4.7/77.6	4.6/65.2	−	−	ns	↑
2	Unknown protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X0701	Maldi-Tof*	64	5	63	4.9/10.7	4.9/12.4	↑	ns	↓	ns
40	Unknown protein	estExt_Genewise1.v1.C_LG_X0701	Maldi-Tof*	60	4	57	4.4/15.1	4.9/12.4	−	−	↓	ns
6004	Unknown protein	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1353	MS/MS*	114	2	17	5.8/10.9	5.7/12.9	↑	ns	−	−
6003	Unknown protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X0897	MS/MS*	94	1	10	5.6/16.2	5.5/14.6	ns	ns	↓	ns
6006	Unknown protein	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X0897	MS/MS*	95	1	10	5.9/17.0	5.6/14.6	ns	↑	↑	ns

Table 2: Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry.
The proteins were extracted from the top or the base of stems inclined at 35° for 45 min or one week (see Material and methods section).
a) Assigned spot number as indicated in fig. 3A and B. b) Assigned name: Blastp. from the JGI database (http://genome.jgi.-psf.org) in *Populus trichocarpa* species
c) Statistical probability of true positive identification of predicted proteins calculated by MASCOT (http://www.matrixscience.com). d) Number of matched peptides.
e) Sequence coverage %: percentage of predicted protein sequence covered by matched peptides. f) Exper pI/Mr, experimental pI and mass of protein in KDa.
g) Theor pI/Mr, theoretical pI and mass of protein in KDa.
The mean of normalized quantities was calculated from three replicates for spots from the control and inclined conditions, and statistical analyzes were performed ($p < 0.05$). ↑ indicates that the spot was significantly upregulated after inclination, compared to the control condition, ↓ indicates that the spot was significantly down-regulated after inclination, (ns) no significant difference was found between the means calculated for the spot in the control and inclined conditions, (−) the spot was present but was not quantified either in the control or inclined condition, (abs) the spot was absent both in control and inclined conditions, (C**) the spot was present in the control but not detected after inclination. The quantitative data are indicated in “supplementary material Appendix S1”. (*) spots identified by both methods: LC-MS/MS.
The sequences of the peptides are indicated in “supplementary material Appendix S2”. The results of the PepNovo / MS-BLAST analyses, which were carried on when only one peptide was produced by MASCOT search, are shown in “supplementary material Appendix S3”.

Figure legends

Fig. 1.
Localization of amyloplasts and tension wood in young poplar stems.
Starch grains were visualized after PAS reaction in the cortex of the stems (arrows).
(A) Longitudinal section of the 15th internode (top) from a plant showing 20 developed internodes. (B) Longitudinal section of the 4th internode (base).
Tension wood was localized using the Astra blue-safranine double staining. Cross section of stems inclined for 45 min (C) or one week (D) were made in the 4th internode (base). The arrow indicates the tension wood on the upper face of the stem.

Fig. 2.
Stem shape evolution during the righting process.
(A) Evolution of the stem shape during gravitropic movement. t_0: inclination, t_1: 45 min after inclination, t_2 to t_6: 1, 3, 4, 5 and 7 days after inclination. (B) Evolution of curvature along the stem for t_1 and t_6. The position of each cross section along the stem is given by its curvilinear abscissa value. For both graphs, the positions of internodes 5 and 13 (for t_1) and 5 and 19 (for t_6) are noted in order to visualize the regions of the stem used for protein extraction.

Fig. 3.
Master gels for poplar stem (top and basal parts). Identified spots are marked with arrows and the numbers indicate the respective proteins identified in Table 2. Proteins of unknown function are circled. (A) Stem gravistimulated for 45 min; (B) stem gravistimulated for one week.

Fig. 4.
Functional classification of the identified protein spots of the poplar stem proteome.

Fig. 5.
Venn diagram of the differentially expressed proteins identified in poplar stems subjected to gravitational stimulation for 45 min. (A) Proteins up-regulated by inclination at the top and the base of the stem; (B) down-regulated proteins. Opposite regulations between the top and the base are highlighted.

Fig. 6.
Venn diagram of the differentially expressed proteins identified in poplar stems subjected to gravitational stimulation for one week. (A) Proteins up-regulated by inclination at the top and the base of the stem; (B) down-regulated proteins. Opposite regulations between the top and the base are highlighted.

Fig. 1

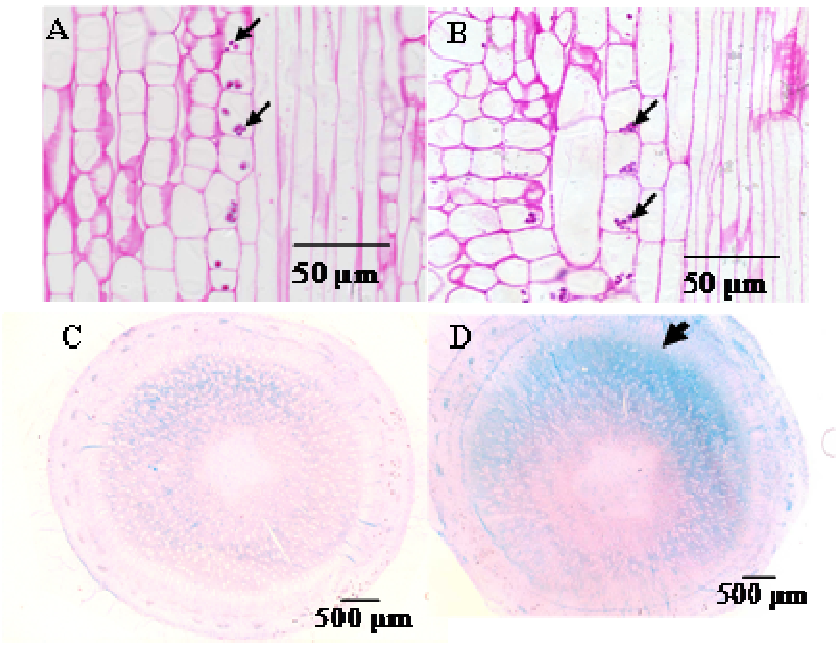


Fig. 2

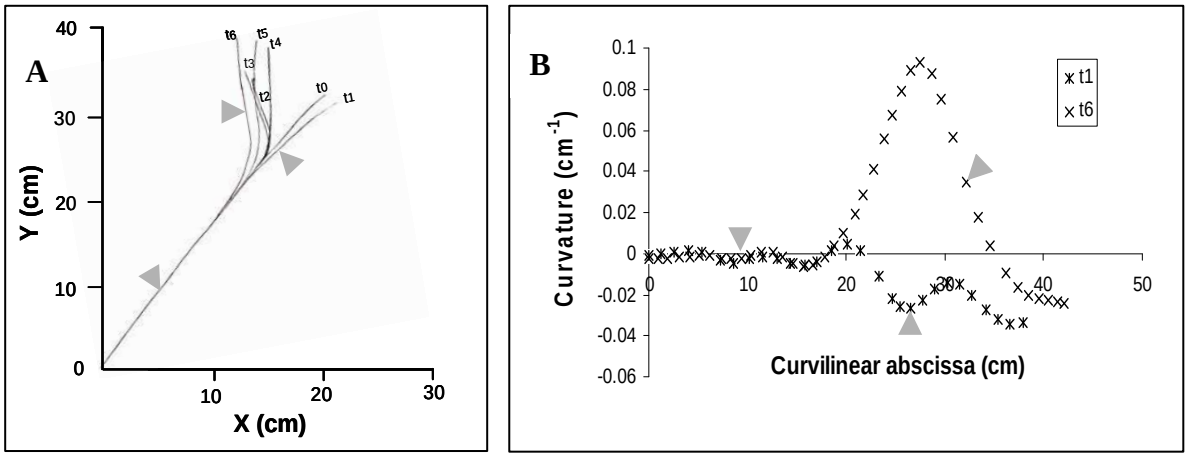

A
Y (cm)
X (cm)
t0
t1
t2
t3
t4
t5
t6
B
Curvature (cm-1)
Curvilinear abscissa (cm)
t1
t6

Fig. 3

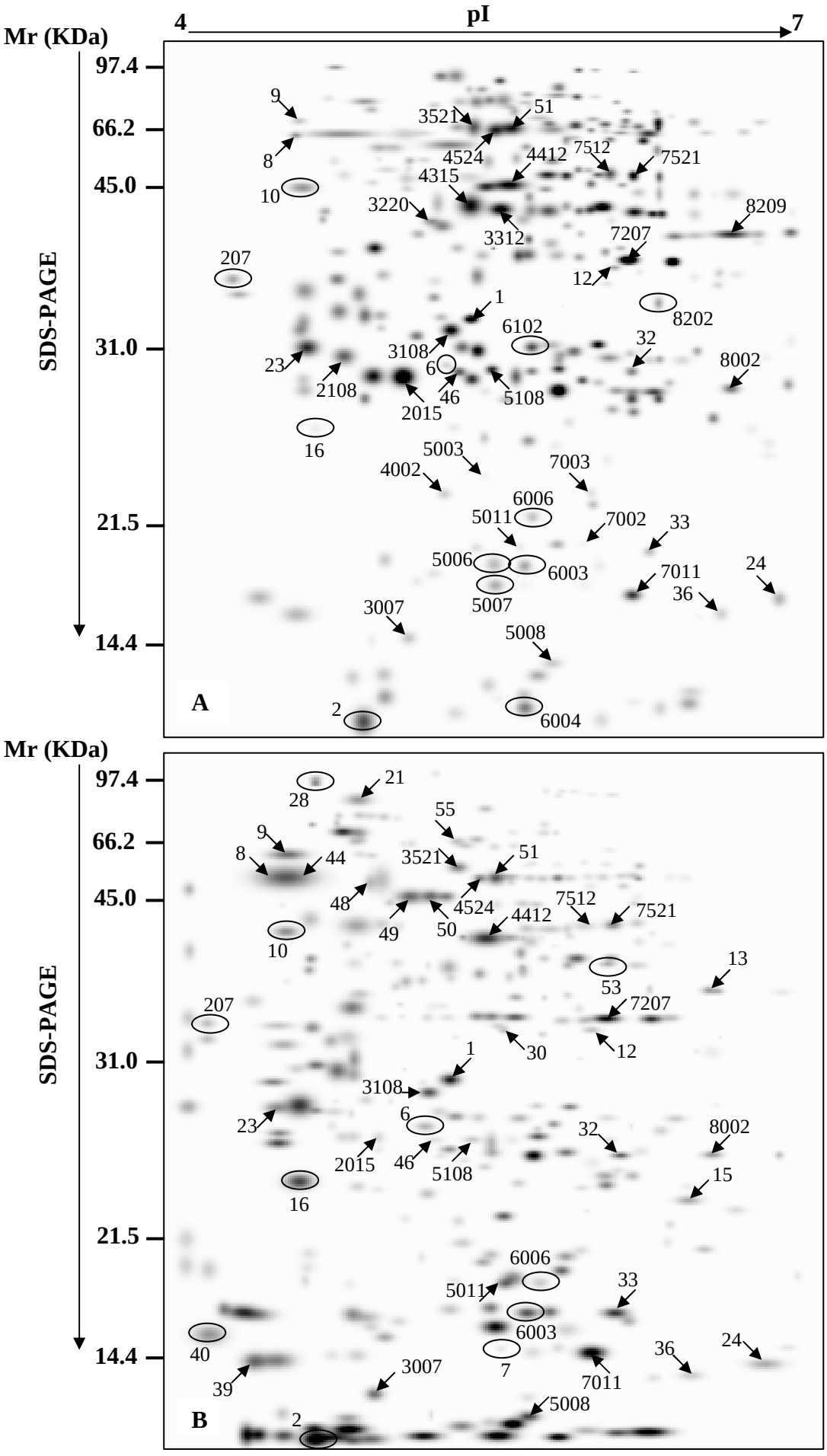

4
pI
7
Mr (KDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
14.4
SDS-PAGE
A
B
9
3521
51
8
4524
4412
7512
7521
4315
10
3220
8209
3312
7207
207
12
1
8202
6102
32
3108
23
6
8002
2108
46
5108
2015
16
5003
4002
7003
6006
5011
7002
33
5006
6003
7011
24
5007
36
3007
5008
2
6004
28
21
55
44
48
49
50
53
13
30
15
40
39
7

Fig. 4

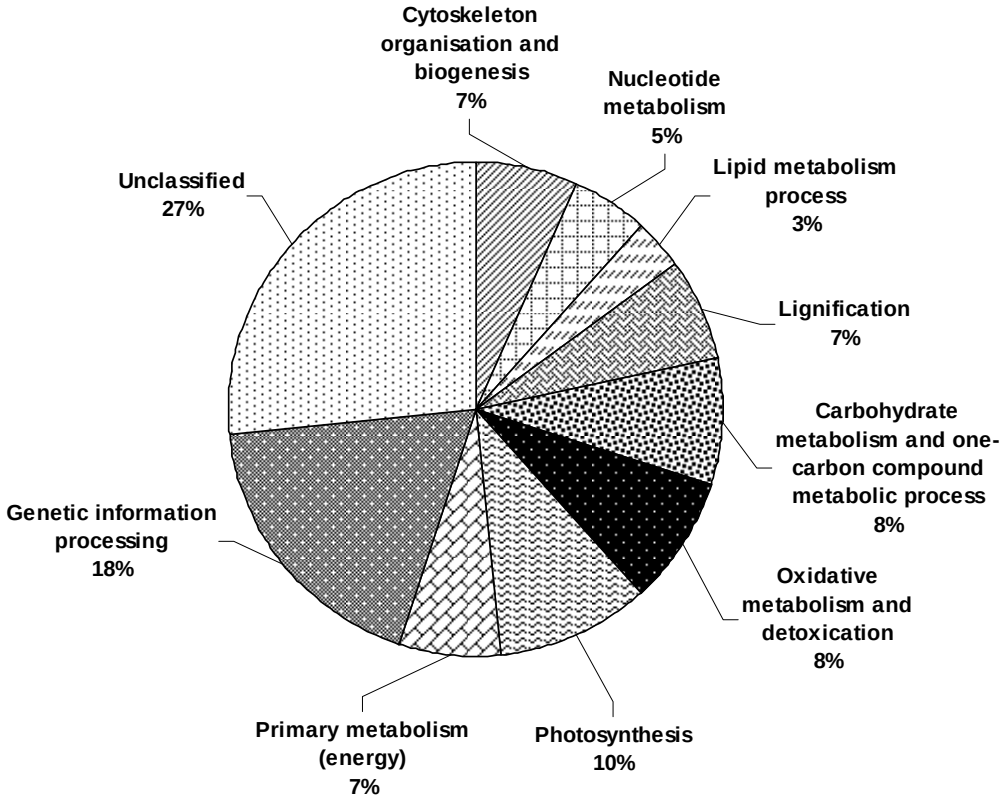

Cytoskeleton organisation and biogenesis 7%
Nucleotide metabolism 5%
Lipid metabolism process 3%
Lignification 7%
Carbohydrate metabolism and one-carbon compound metabolic process 8%
Oxidative metabolism and detoxication 8%
Photosynthesis 10%
Primary metabolism (energy) 7%
Genetic information processing 18%
Unclassified 27%

Fig. 5

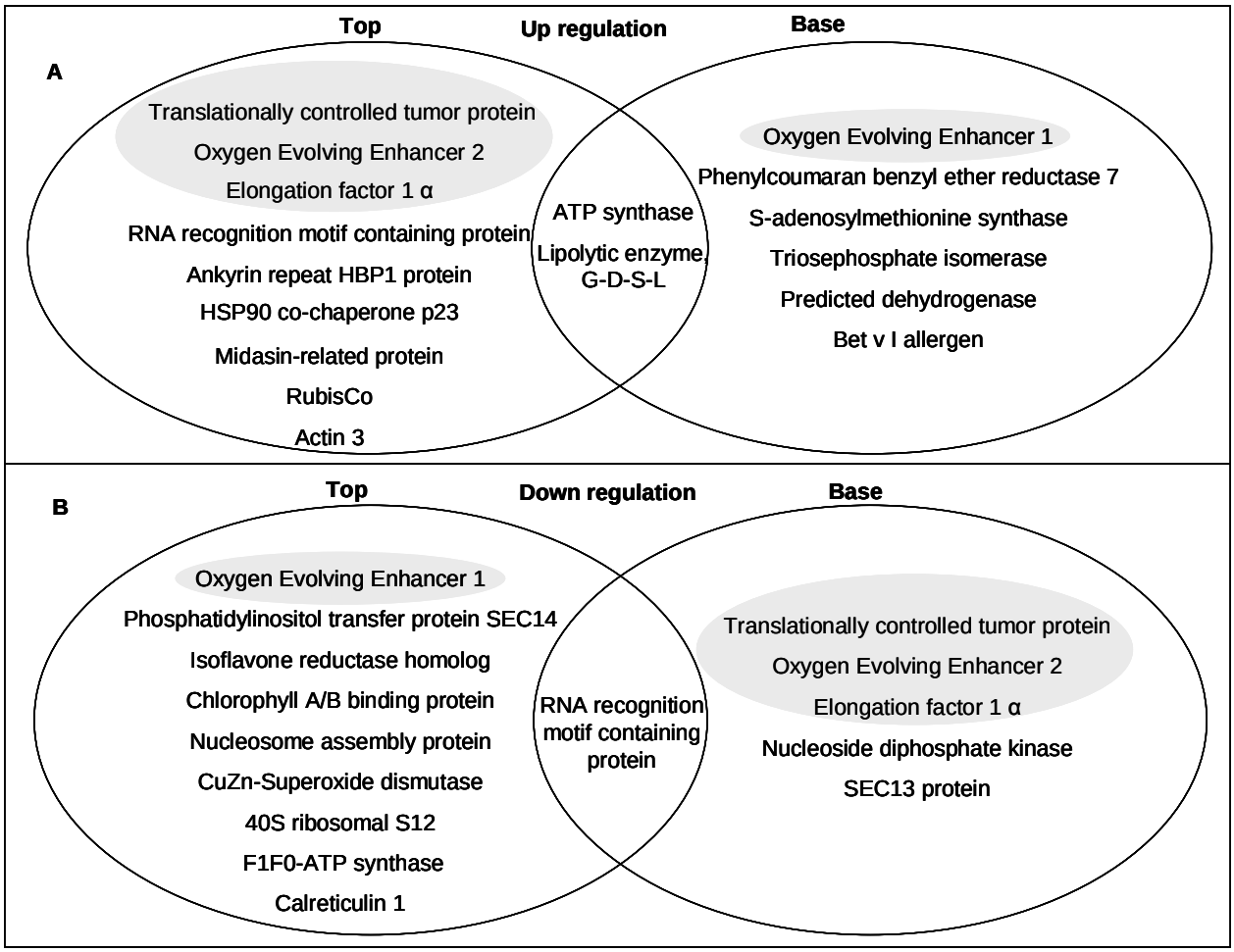
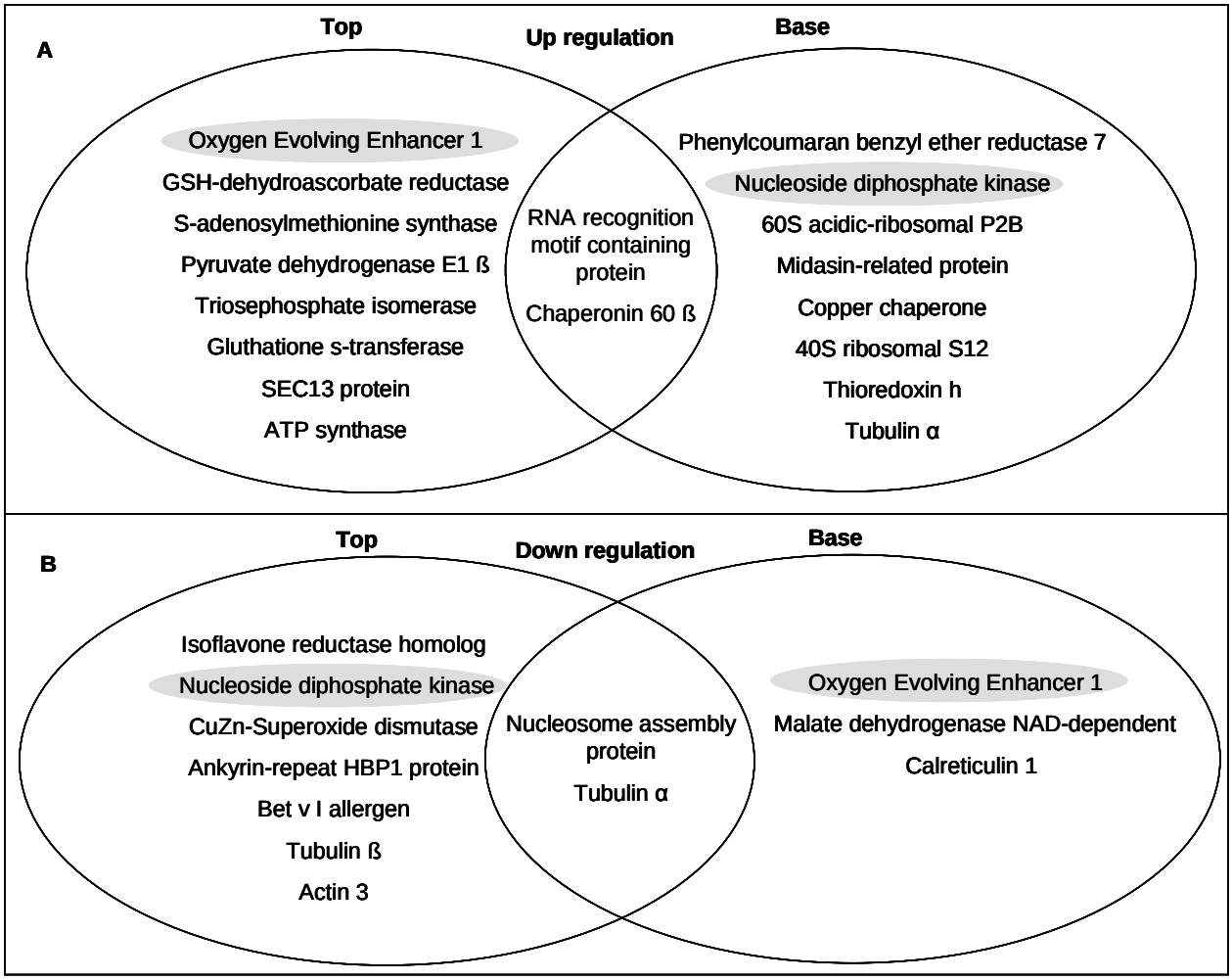

A
Top
Up regulation
Base
Translationally controlled tumor protein
Oxygen Evolving Enhancer 2
Elongation factor 1 α
RNA recognition motif containing protein
Ankyrin repeat HBP1 protein
HSP90 co-chaperone p23
Midasin-related protein
RubisCo
Actin 3
ATP synthase
Lipolytic enzyme, G-D-S-L
Oxygen Evolving Enhancer 1
Phenylcoumaran benzyl ether reductase 7
S-adenosylmethionine synthase
Triosephosphate isomerase
Predicted dehydrogenase
Bet v I allergen
B
Top
Down regulation
Base
Oxygen Evolving Enhancer 1
Phosphatidylinositol transfer protein SEC14
Isoflavone reductase homolog
Chlorophyll A/B binding protein
Nucleosome assembly protein
CuZn-Superoxide dismutase
40S ribosomal S12
F1F0-ATP synthase
Calreticulin 1
RNA recognition motif containing protein
Translationally controlled tumor protein
Oxygen Evolving Enhancer 2
Elongation factor 1 α
Nucleoside diphosphate kinase
SEC13 protein

Fig. 6


A
Top
Up regulation
Base
Oxygen Evolving Enhancer 1
GSH-dehydroascorbate reductase
S-adenosylmethionine synthase
Pyruvate dehydrogenase E1 ß
Triosephosphate isomerase
Gluthatione s-transferase
SEC13 protein
ATP synthase
RNA recognition motif containing protein
Chaperonin 60 ß
Phenylcoumaran benzyl ether reductase 7
Nucleoside diphosphate kinase
60S acidic-ribosomal P2B
Midasin-related protein
Copper chaperone
40S ribosomal S12
Thioredoxin h
Tubulin α
B
Top
Down regulation
Base
Isoflavone reductase homolog
Nucleoside diphosphate kinase
CuZn-Superoxide dismutase
Ankyrin-repeat HBP1 protein
Bet v I allergen
Tubulin ß
Actin 3
Nucleosome assembly protein
Tubulin α
Oxygen Evolving Enhancer 1
Malate dehydrogenase NAD-dependent
Calreticulin 1

Chapitre IV

Principaux résultats acquis par :

RT-qPCR

Western blot et immunolocalisation *in situ*

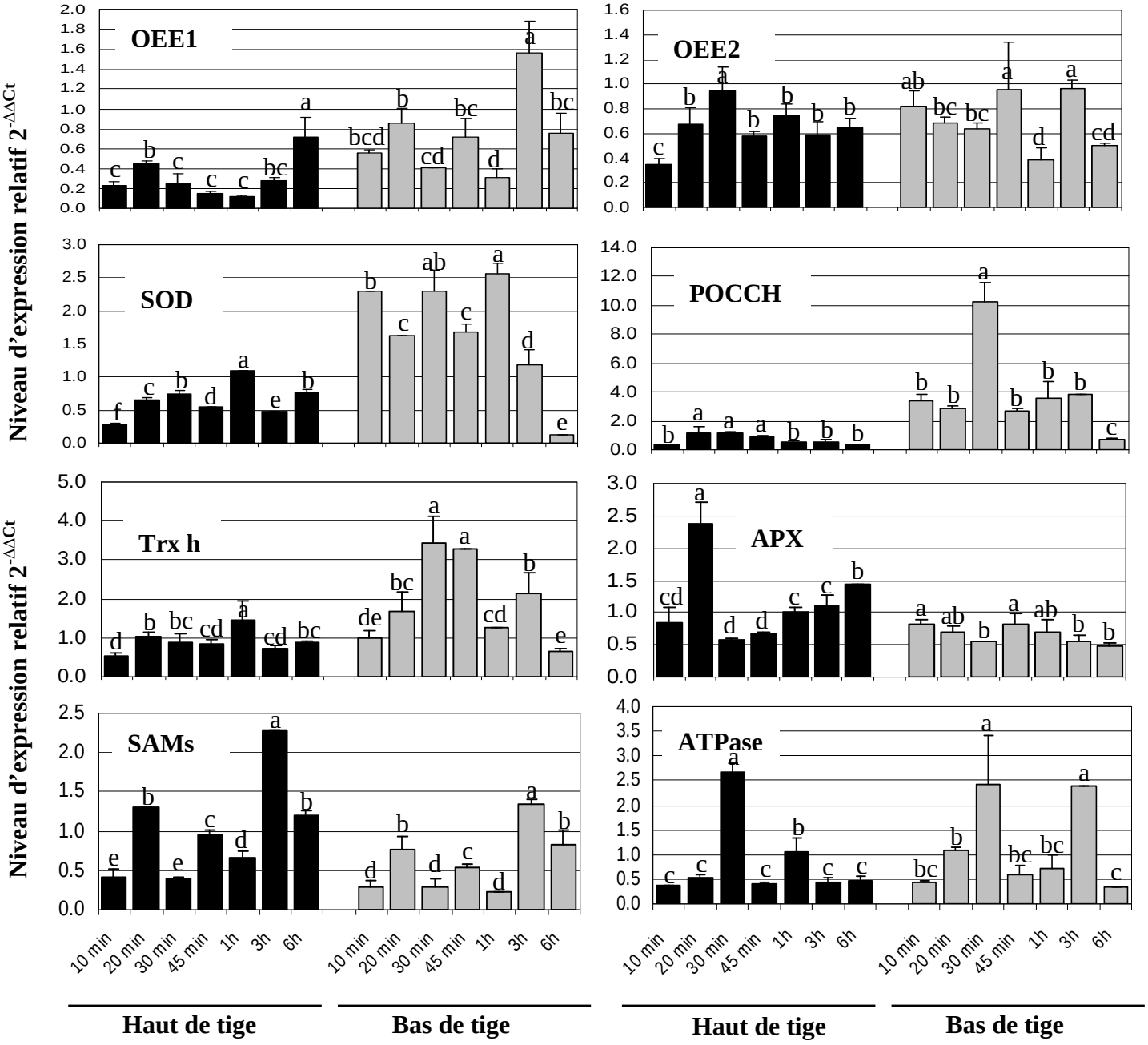


Figure 19 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes dans la tige de peuplier en réponse à la gravité. Les valeurs présentées sont les moyennes des niveaux d'expression des gènes en cinétique au niveau des entre-neouds supérieurs (Haut de tige) et inférieurs (Bas de tige). Une plante a été utilisée à chaque temps. L'expression des gènes est déterminée pour chaque point en utilisant trois répétitions techniques indépendantes. L'abondance de transcrits pour chaque gène a été normalisée avec le niveau d'expression de transcrits du gène référence ARN 18S. L'abondance de transcrits de gènes dans les échantillons témoins et traités est obtenue par l'équation $2^{-\Delta\Delta Ct}$, comme décrit par Livak et Schmittgen (2001). Le niveau d'expression du peuplier témoin droit a été pris comme condition de référence dans le calcul pour déterminer le niveau « 1X » d'expression des gènes.

Les barres verticales indiquent les erreurs standards.

A. Suivi de l'expression des gènes codant pour des protéines régulées par l'inclinaison

Quantification de l'expression de gènes en cinétique par RT-PCR quantitative

Nous avons sélectionné 8 protéines différentiellement exprimées lors de l'analyse protéomique et qui sont potentiellement régulées par la thioredoxine (OEE1, OEE2, Cu-Zn SOD, POOCH, Trx h1, APX, SAMs, ATPase). Une analyse par RT-PCR quantitative a été réalisée pour étudier les variations d'expression des gènes codant pour ces protéines lors de l'inclinaison sur une cinétique courte (10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1h, 3h, et 6h). Le niveau d'expression du peuplier témoin droit a été pris comme condition de référence dans le calcul du niveau d'expression des gènes (niveau 1X). Les résultats de cette étude montrent une variabilité d'accumulation des transcrits entre les entre nœuds supérieurs et inférieurs (Figure 19), montrant ainsi que chaque tissu répond différemment à la gravité. Une répétition biologique sur un autre lot d'arbre montre une réponse similaire.

Nous avons suivi l'expression de deux gènes codant des protéines impliquées dans la photosynthèse: oxygen evolving enhancer 1 (OEE1) et oxygen evolving enhancer 2 (OEE2). Les deux gènes présentent une expression qui diminue au niveau des entre nœuds supérieurs et inférieurs, pendant la durée d'application du stimulus gravitationnel (Figure 19). Pour l'OEE1 le profil d'expression au niveau des entre nœuds supérieurs va dans le même sens que celui obtenu au niveau protéique, tandis qu'au niveau des entre nœuds inférieurs l'expression va dans le sens opposé. De manière opposée, le profil d'expression de l'OEE2 au niveau des entre nœuds inférieurs va dans le même sens que celui obtenu au niveau protéique et dans le sens opposé au niveau des entre nœuds supérieurs. L'expression de la superoxyde dismutase (SOD) impliquée dans le métabolisme oxidatif, augmente au niveau des entre nœuds inférieurs après des temps de stress très courts (10 min, 20 min, 30 min, 45 min, et 1 h) et une diminution après 3 h et 6 h de stress (Figure 19). Le profil d'expression de la SOD au niveau des entre nœuds supérieurs va dans le même sens que celui obtenu au niveau protéique, après 45 min de stress. Une autre protéine, impliquée dans la défense, présente une baisse d'expression au niveau des entre nœuds supérieurs pendant la durée d'application du stimulus gravitationnel. Elle correspond à une copper chaperone (POCCH). L'expression de cette protéine augmente au niveau des entre nœuds inférieurs, après des temps d'inclinaison très courts (10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, et 3 h), et diminue après 6 h d'inclinaison (Figure 19).

Aucun changement d'abondance de cette protéine n'a pu être détecté au niveau protéique sur des peupliers inclinés durant 45 min. L'expression de la Thioredoxine de type h1 (Trx h1), augmente au niveau des entre-nœuds inférieurs, après des temps de stress de 30 min, 45 min et 3 h, et diminue 6 h après le stress (Figure 19). Sur des peupliers inclinés durant 45 min, au niveau protéique, la variation d'abondance de la Trx h1 est plus faible et non significative. Pour l'APX impliquée dans le métabolisme oxydatif un pic d'expression est observé à 20 min d'inclinaison. Cette protéine présente une faible diminution de l'accumulation des transcrits au niveau des entrenœuds inférieurs au cours de la cinétique d'inclinaison (Figure 19). Nous n'avons pas observé de changement significatif d'abondance des transcrits de la protéine APX sur des peupliers inclinés durant 45 min. Le gène codant la protéine s-adénosylméthionine synthase impliquée dans la biosynthèse des lignines, présente des pics d'accumulation de transcrits au niveau des entre nœuds supérieurs et inférieurs après 20 min et 3h d'inclinaison (Figure 19). Au niveau protéique, après 45 min de stress, cette protéine présente une augmentation d'accumulation dans les entre nœuds inférieurs. Nous avons également suivi l'expression d'une protéine sur-exprimée au niveau protéique. Cette protéine l'ATP synthase est impliquée dans la régulation des différentes voies métaboliques pour la production d'énergie. On observe un pic d'accumulation des transcrits après 30 min d'inclinaison dans les entre-noeuds supérieurs et inférieurs. Un deuxième pic est observé après 1h (entre-noeuds supérieurs) ou 3h (entre-noeuds inférieurs).

B. Analyse protéique par western blot et immunolocalisation *in situ* de la thioredoxine Trx h1 et Trx h2

Parmi les protéines (60) différentiellement exprimées dans les conditions testées (tableau 2 page 94), 20 sont potentiellement régulées par la thioredoxine (Trx) (protéines colorées en rouge, tableau 2 page 94). La thioredoxine peut réguler des protéines impliquées dans de nombreux processus métaboliques (métabolisme de l'amidon, métabolisme des lipides, métabolisme des acides aminés, métabolisme des carbohydrates, métabolisme oxydatif, dans la défense et la structure des protéines (Marchand et *al.*, 2004 ; Balmer et *al.*, 2006). Ces observations ont amené à vérifier l'expression de la thioredoxine dans les tiges inclinées.

B.1 Régulation de la thiorédoxine

Afin d'étudier la régulation de la Trx, lors de la déformation de la tige et de la mise en place du bois de tension, nous avons vérifié l'abondance et la localisation de cette protéine après 45 min et une semaine d'inclinaison. Des analyses par western blot et par immunolocalisation *in situ*, utilisant des anticorps spécifiques anti-Trx h1 et anti-Trx h2 ont été réalisées.

B.1.1 Analyse par western blot

Les résultats obtenus par western blot montrent que 45 min d'inclinaison ne modifient pas l'accumulation de la protéine Trx h1, tandis qu'une semaine d'inclinaison entraîne une augmentation de l'accumulation de Trx h1 au niveau des entre-nœuds supérieurs et inférieurs. La bande obtenue correspond exactement à celle attendue pour la protéine thioredoxine h1 (14 kD) (Figure 20 C). La détection de la protéine Trx h2 n'est pas claire (Figure 20 D). Il semble que l'expression de Trx h2 soit stable dans les entre-noeuds supérieurs et inférieurs et dans les différentes conditions testées.

B.1.2 Immunolocalisation *in situ* de Trx h1 et Trx h2

L'immunolocalisation *in situ* de la Trx h1 et Trx h2 a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifique au niveau des entre-nœuds supérieurs et inférieurs des tiges inclinées durant 45 min et une semaine. Les résultats indiquent clairement et de manière reproductible que Trx h1 et Trx h2 ont été détectées au niveau des cellules parenchymateuses de la tige au niveau des grains d'amidon (figure 21 et 22 a, b). On peut noter néanmoins que le marquage est variable entre les entrenœuds supérieurs et inférieurs. Les cellules des entrenœuds inférieurs semblent présenter un marquage plus important que les cellules des entrenœuds supérieurs. Ces différences sont peut être dues à une quantité d'amidon plus faible au niveau des entrenœuds supérieurs qu'au niveau des entrenœuds inférieurs.

Afin de vérifier que ce marquage n'est pas dû à une fixation aspécifique de l'anticorps secondaire, plusieurs coupes ont été incubées dans le tampon sans l'anticorps primaire. Après plusieurs lavages, les coupes ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire : dans ce cas, aucun marquage n'a été observé (figure 21 et 22 c, d, g, h).

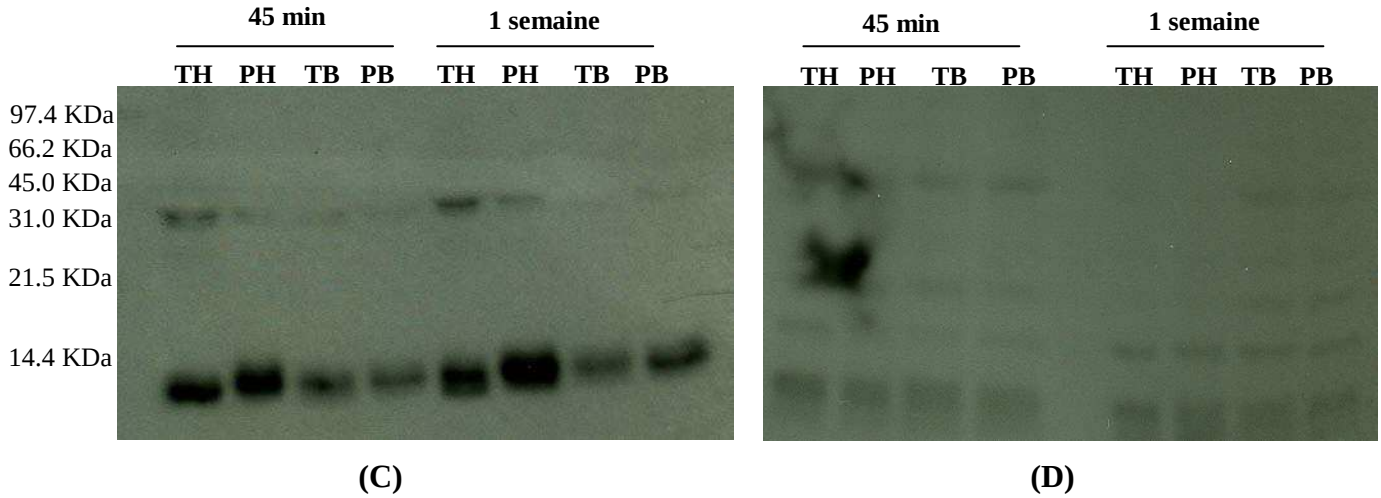


Figure 20 : Western blot réalisé avec 40 µg de protéines totales extraites des entre-nœuds supérieurs (H) et inférieurs (B) de tige de peuplier non inclinée (T) ou inclinée de 35° (P) durant 45 min et une semaine. Les protéines thioredoxine 1 et 2 ont été détectées grâce à des anticorps spécifiques de Trx h1 (C) et de Trx h2 (D), fournis par Nicolas Rouhier Université Henry Poincaré (Nancy).

TH : Témoin haut, PH : Penché haut, TB : Témoin bas, PB : Penché bas

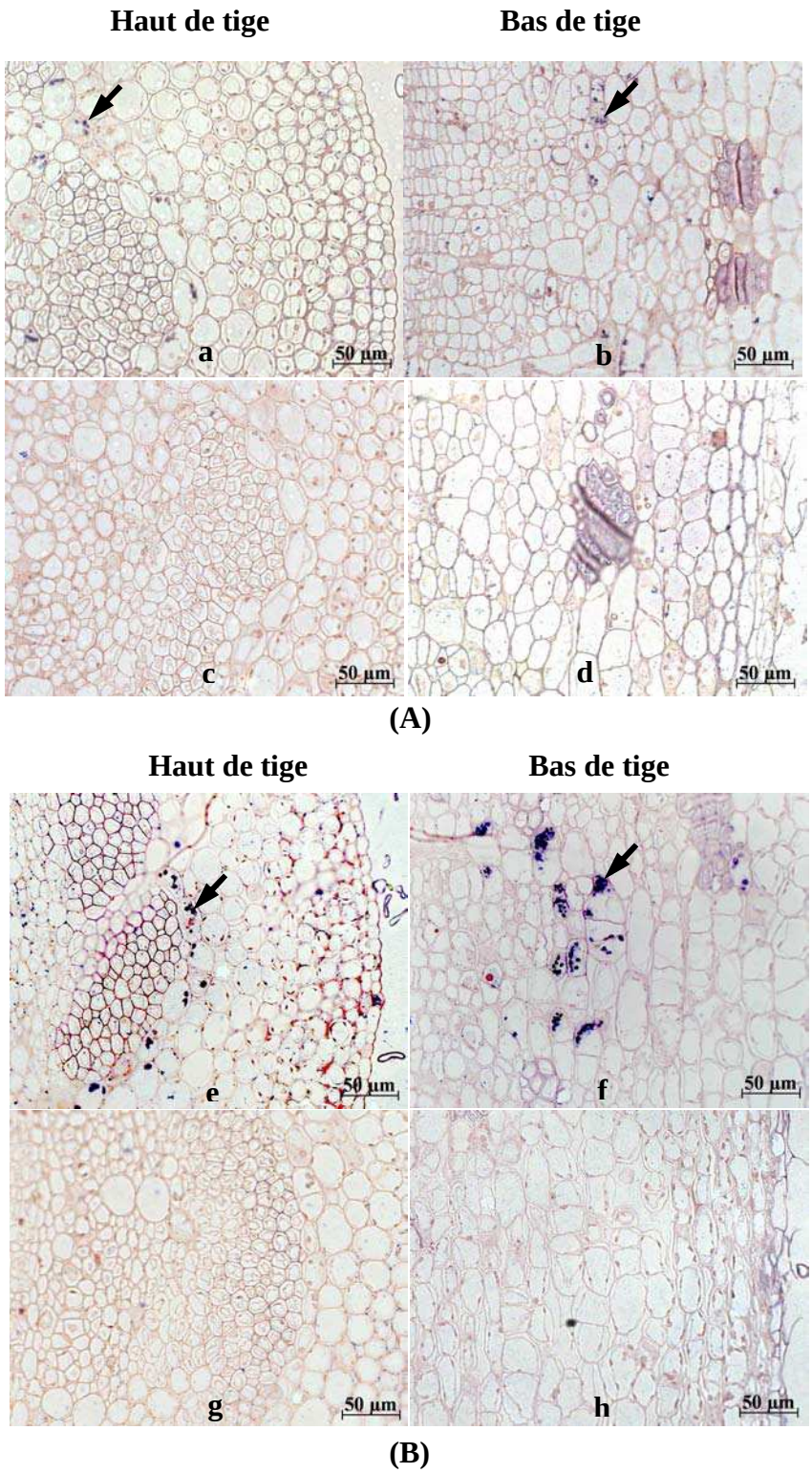


Figure 21: Immunolocalisation *in situ* de la protéine Trx h1 dans la partie supérieure (a, c, e, g) et inférieure (b, d, f, h) de tige de peuplier inclinée de 35° durant 45 min (A) et une semaine (B). La protéine Trx h1 est détectée dans les cellules parenchymateuses, au niveau des grains d'amidon (a, b, e, f) (coloration bleue indiquée par la flèche).

Aucun marquage n'est mis en évidence dans le cas du témoin négatif sans anticorps primaire (c, d, g, h). (Anticorps fourni par Nicolas Rouhier Université Henry Poincaré, Nancy).

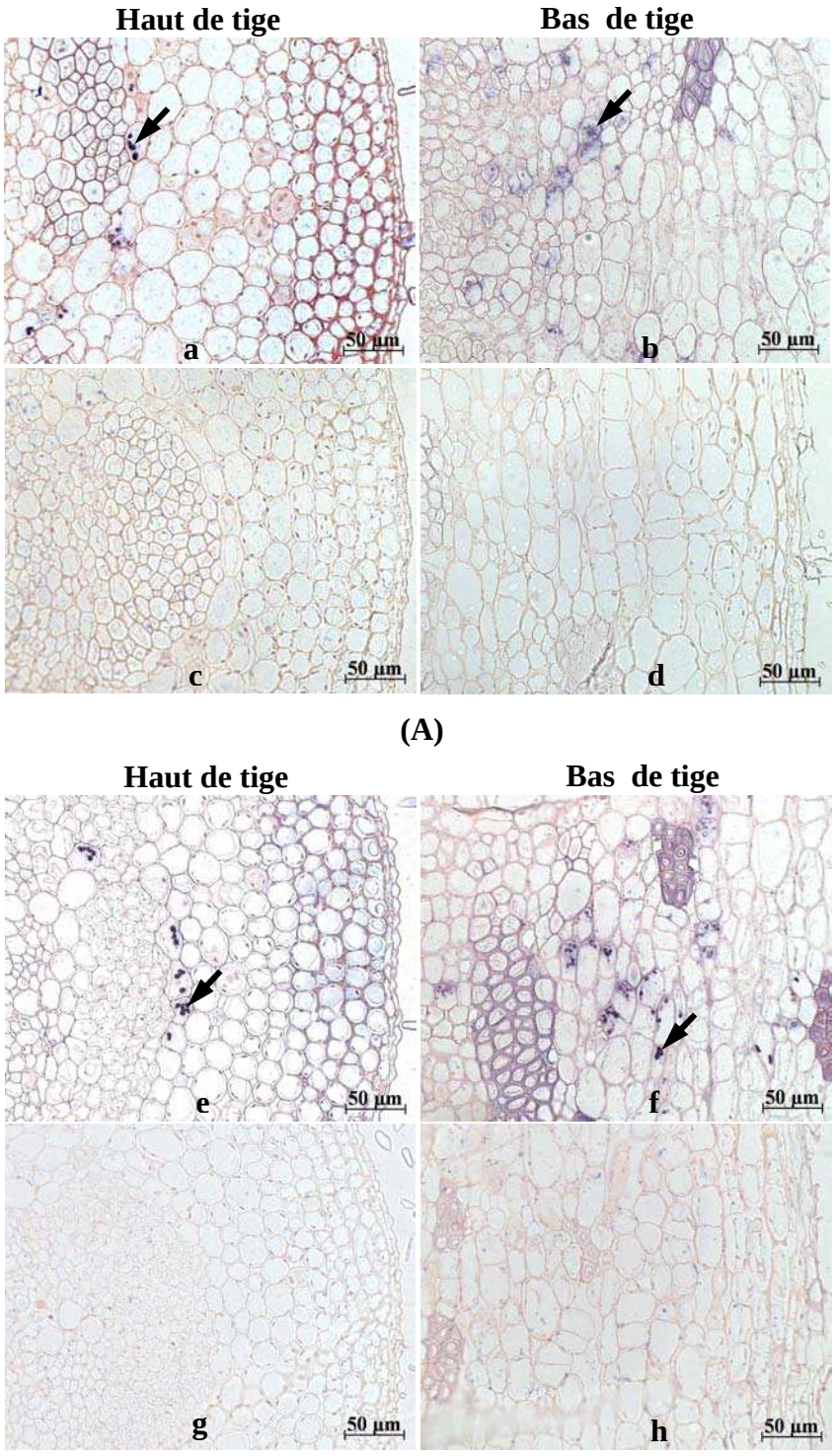


Figure 22: Immunolocalisation *in situ* de la protéine Trx h2 dans la partie supérieure (a, c, e, g) et inférieure (b, d, f, h) de tige de peuplier inclinée de 35° durant 45 min (A) et une semaine (B). La protéine Trx h2 est détectée dans les cellules parenchymateuses, au niveau des grains d'amidon (a, b, e, f) (coloration bleue indiquée par la flèche).

Aucun marquage n'est mis en évidence dans le cas du témoin négatif sans anticorps primaire (c, d, g, h). (Anticorps fourni par Nicolas Rouhier Université Henry Poincaré, Nancy).

Chapitre V

Discussion

A. Caractérisation du stimulus gravitropique et du processus de redressement de la tige

Il est très largement admis que le gravitropisme, réponse de croissance d'un végétal à l'effet de la pesanteur terrestre, constitue le mécanisme par lequel les plantes se repèrent dans l'espace. Les tiges ligneuses ou non présentent une capacité à se redresser activement suite à une perturbation de leur inclinaison. L'angle d'inclinaison que nous avons appliqué sur les jeunes arbres pendant une semaine a été suffisant pour induire une réponse gravitropique. L'éclairage a été disposé à la verticale des plantes afin de se rapprocher au maximum des conditions environnementales. Dans ce cas le redressement de la tige est aussi relié au phénomène de phototropisme (dans le cas d'inclinaison une semaine). Il serait intéressant de réfléchir à un plan d'expérience qui permettrait d'analyser indépendamment les effets du stimulus gravitropique et de l'orientation de la lumière ainsi que de leur interaction. Le redressement gravitropique implique un processus de courbure locale dont le mécanisme est lié soit à une élongation différentielle dans les zones en croissance primaire, soit à la différentiation de bois de réaction ayant des retraits différentiels, dans les zones en croissance secondaire (Moulia et *al.*, 2007). Coutand et *al.* (2007) ont remarqué qu'un redressement via un mécanisme de courbure implique nécessairement une dé-courbure d'une grande partie de la tige afin que celle-ci soit de nouveau verticale. Cette contre courbure apparait de manière anticipée avant que la tige ne passe la verticale et est donc liée non pas à un pur gravitropisme mais à une réaction par rapport à la forme de la tige elle-même ou autotropisme. Ces derniers auteurs ont pu confirmer que la perception de l'inclinaison n'est pas suffisante et que la contre-courbure est bien un mécanisme d'auto-tropisme lié à la perception de la courbure ou d'une variable associée (comme par exemple la déformation). Dans nos conditions expérimentales, à 45 min d'inclinaison, la tige ne se redresse pas encore et les régulations que nous observons ne sont pas liées au mécanisme d'auto-tropisme. Par contre, après une semaine d'inclinaison, il est possible que les régulations observées soient les conséquences des stimulations gravitropiques et autotropiques.

La formation des bois de réaction se réalise si la phase de stimulation se produit pendant une durée critique. Dans le cas de la formation du bois de tension, cette phase de stimulation est en général de 24 à 48 heures (Jourez et Avella-Shaw, 2003). Un temps de présentation de 6 heures est nécessaire pour la formation du bois opposé (Jourez et Avella-Shaw, 2003). Nos conditions expérimentales nous permettent d'étudier la réponse gravitropique lors de la déformation de la tige (45 min d'inclinaison) et lors de la mise en

place du bois de tension (une semaine d'inclinaison). Une stimulation d'une semaine a été suffisamment longue pour permettre la formation du bois de tension.

Nous avons choisi d'étudier les réponses de la plante au niveau des parties apicale et basale de la tige de peuplier, afin de mieux comprendre d'une part les mécanismes liés à l'élongation différentielle (courbure locale) dans les zones en croissance primaire et d'autre part les mécanismes liés à la différentiation de bois de réaction, dans les zones en croissance secondaire.

B. Observation anatomique

B.1 Formation de bois de tension

Nous pouvons noter qu'une durée d'exposition au stimulus de 45 min n'est pas suffisante pour induire la formation du bois de tension. Cette observation est en accord avec les résultats de Jourez et Avella-Shaw, (2003). On a remarqué que dans les 2 heures qui suivent l'inclinaison à 35°, la partie terminale de la tige se dé-courbe vers le haut pour se repositionner à la verticale. De tels mouvements rapides et spontanés sont vraisemblablement dus à des variations de pression de turgescence au sein des cellules de la pousse terminale (Moulia et *al.*, 2006). Ils ne doivent pas être confondus avec des redressements plus lents et progressifs résultant de la formation d'un tissu de bois de tension (Jourez et Avella-Shaw, 2003). Le bois de tension apparaît très clairement une semaine après l'inclinaison au niveau de la partie basale de la tige, une zone en croissance secondaire (figure 13). Ici, le redressement implique un processus de courbure lié à la différentiation du bois de réaction (Moulia et *al.*, 2007). Aucun bois de tension n'a été détecté au niveau de la partie apicale même après une semaine d'inclinaison (figure 14), ce qui suggère que dans cette zone le redressement implique un processus de courbure local lié à une élongation différentielle (Moulia et *al.*, 2007).

B.2 Localisation des amyloplastes

Les observations anatomiques des coupes longitudinales et transversales de peuplier nous ont permis de visualiser les amyloplastes sédimentés à la base des cellules parenchymateuses entourant les vaisseaux conducteurs. On peut donc supposer que comme

chez les herbacées (Moctezuma et Feldman, 1999), la sédimentation des amyloplastes est à l'origine de la perception de la gravité. Mochtezuma et Feldman (1999) ont montré que chez *Arachis hypogaea* les amyloplastes sédimentent dans la direction du vecteur gravité 30 min après une réorientation. Les mutants dont les statocytes contiennent une quantité réduite en amidon dans les amyloplastes ont une croissance tout à fait normale, mais sont moins sensibles au stimulus gravitropique que les plantes sauvages (Kiss et *al.*, 1996). L'analyse génétique des mutants *d'Arabidopsis thaliana* (*sgr*) a suggéré que la vacuole contribue à la perception de la gravité dans la tige en affectant la sédimentation des amyloplastes (Morita et Tasaka, 2004).

B.3 Etude de la protéine thioredoxine h

A l'issue de notre approche protéomique, 20 protéines différentiellement exprimées se sont révélées être potentiellement régulées par la thioredoxine (protéines colorées en rouge tableau 2 page 94), ce qui représente 34% des protéines que nous avons identifiées par spectrométrie de masse. Les thioredoxines sont des protéines de faible poids moléculaire, qui ont été mises en évidence chez un grand nombre d'organismes, où elles catalysent différentes réactions d'oxydoréduction impliquant des échanges dithiolsulfhydryles.

Chez les plantes, il y a 3 types de thioredoxines, les 2 premières (Trx m et f), sont des thioredoxine ferrédoxines-dépendantes, localisées dans les chloroplastes, où elles interviennent dans la régulation de la photosynthèse. Un troisième type, dénommé thioredoxine h, a été mis en évidence dans le cytosol. La thioredoxine h fait partie d'un système Trx NADP-dépendant, où elle est associée au NADPH et à une enzyme dénommée NADP-thioredoxine réductase. Les Trx h agissent notamment en réduisant les ponts disulfures de certaines protéines de réserves telles que les gliadines et les gluténines (Kobrehel et *al.*, 1992).

Des anticorps dirigés contre les protéines Trx h1ou Trx h2 nous ont permis de montrer par western blot une forte abondance de Trx h1 au niveau des entre nœuds inférieurs et supérieurs de tige inclinée pendant une semaine (figure 20). On observe une bande fortement marquée à 14 KDa, ce qui correspond à la taille attendue de la protéine. Bien que l'accumulation de Trx h1 ne semble pas être modifiée de manière significative après 45 min d'inclinaison, on observe une accumulation des transcrits Trx h1 dans les entre nœuds

inférieurs 45 min après l'inclinaison (figure 19). En revanche, l'anticorps ne met pas en évidence d'accumulation de protéine Trx h2 (figure 20). Ces résultats restent préliminaires. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations.

Lors de l'analyse par immunolocalisation *in situ*, les protéines Trx h1 et Trx h2 ont été détectées dans les tiges inclinées pendant 45 min et une semaine (figure 21 et 22) mais aussi dans les tiges non inclinées (résultats non montrés). Le marquage apparaît dans des cellules parenchymateuses au niveau des amyloplastes. Ces données laissent supposer un rôle de la thioredoxine en relation avec les amyloplastes dans la réponse gravitropique. D'après Buchanan et Balmer (2005) environ 200 protéines semblent être régulées par la thioredoxine dans les plantes. De plus, il a été montré que 40 protéines identifiées dans les organites des feuilles d'*Arabidopsis* sont des cibles de la thioredoxine (Marchand et *al.*, 2004). Récemment, les cibles des thioredoxines dans les mitochondries ont été recherchées en utilisant une approche protéomique. Un grand nombre de protéines (au moins 50) impliquées dans 12 processus sont ainsi potentiellement réduites par des thioredoxines mitochondriales (Balmer et *al.*, 2004). Les thioredoxines h sont très abondantes dans le phloème, suggérant un rôle dans la régulation redox dans les tissus vasculaires (Ishiwatari et *al.*, 1995). La thioredoxine h pourrait agir sur des protéines cibles impliquées dans de nombreux processus métaboliques tels que le métabolisme de l'amidon, des acides aminés, des nucléotides, des lipides, des carbohydrates, oxidatifs, dans la défense et la structure des protéines (Marchand et *al.*, 2004 ; Balmer et *al.*, 2006). Récemment, cette protéine a été détectée dans les amyloplastes isolés de l'endosperme et de chloroplastes de blé où elle agit comme un régulateur entre la photosynthèse et les processus métaboliques dans les amyloplastes (Balmer et *al.*, 2006). Des études actuelles ont suggéré un rôle de la thioredoxine dans les amyloplastes. D'abord, certaines enzymes localisées dans les amyloplastes, peuvent être régulées par la thioredoxine, à savoir, ADP-glucose pyrophosphorylase (Ballicora et *al.*, 2000), NADP-glucose 6-phosphate dehydrogénase (Wendt et *al.*, 2000) et α-glucan (Mikkelsen et *al.*, 2005). Ensuite une analyse du protéome des amyloplastes a montré la présence d'un certain nombre d'autres enzymes qui, dans le chloroplaste, sont liées à la thioredoxine (Balmer et *al.*, 2006). Cependant, la présence d'un système complet de la thioredoxine dans les amyloplastes n'a pas été encore prouvée. L'identification des cibles de la thioredoxine dans les fractions solubles et membranaires des plastes, mitochondries, noyau et membrane plasmique devrait mener à l'élucidation des mécanismes de régulation des protéines liées à la thioredoxine (Rossignol et *al.*, 2006).

C. Identification des gènes dont l'expression est régulée par un stimulus gravitropique

Au cours de nos travaux de recherche, nous avons entrepris des analyses globales des profils des protéines et des transcrits de peuplier suite à une stimulation gravitationnelle. La première approche est basée sur l'utilisation combinée de l'électrophorèse bidimensionnelle et de la spectrométrie de masse, tandis que la seconde, est basée sur l'hybridation de la puce à ADN avec un échantillon biologique, marqué par une molécule fluorescente. Les ARN messagers transcrits sont éventuellement traduits en protéines, mais la corrélation entre les abondances de ces deux types de molécules n'est pas absolue (Greenbaum et *al.*, 2002).

Nous avons analysé les modifications de l'accumulation des protéines après inclinaison des tiges de peuplier pendant 45 min ou une semaine. Seul l'effet de 45 min d'inclinaison a été analysé au niveau transcriptomique.

Dans ce chapitre, nous présentons une discussion des résultats obtenus par la puce à ADN, les résultats obtenus par gels 2D ayant déjà été discutés dans l'article.

Lors du redressement de l'arbre, la mise en place du bois de tension se fait par l'intermédiaire d'une expression coordonnée d'un certain nombre de gènes impliqués dans différentes catégories fonctionnelles telles que l'expression des gènes et des protéines, la biosynthèse de la lignine, métabolismes des acides aminés, des nucléotides, des carbohydrates, du cytosquelette, du transport, de la paroi cellulaire et du métabolisme primaire et secondaire (Figure 17).

C.1 Expression des gènes et des protéines

Cette classe comporte l'ensemble des gènes impliqués dans la perception et la transduction du signal, la transcription, la traduction, l'assemblage, la modification et la dégradation des protéines. Ceci concerne 103 gènes dont 53 sont sur-exprimés et 50 sous-exprimés (figure 16).

Les gènes impliqués dans la régulation de la transcription semblent avoir un rôle très important dans la réponse à la gravité. Nous avons identifié 12 facteurs d'initiation de transcription ***eIF-1/SUI1*** présentant une sous-expression. Ce gène ***eIF-1/SUI1*** a été aussi

identifié en condition de stress hydrique chez le pin maritime (Dubos et *al.*, 2003). Quatre gènes intervenant dans la régulation de l'initiation de la transcription ***eIF4-gamma/eIF5/EIF2-epsilon*** présentent une sous-expression. Onze ***eIF-5A*** présentent une sur-expression suite à la stimulation gravitationnelle. ***eIF-5A*** n'agit pas en tant que facteur conventionnel d'initiation de traduction parce qu'il semble ne pas être nécessaire pour la synthèse globale de protéines, mais semble fonctionner comme protéine de transport nucléocytoplasmique (Faurobert et *al.*, 2007). Cette protéine est censée jouer un rôle déterminant dans la traduction des ARN messagers lors de la division ou la mort des cellules (Thompson et *al.*, 2004).

Un ***facteur d'élongation G*** (***EF-G***) impliqué dans la synthèse des protéines, présente une sur-expression suite à l'inclinaison. Pendant le cycle d'élongation des peptides, ***EF-G*** facilite la translocation des ARNt (Modolell et *al.*, 1973).

Nous avons aussi identifié 11 molécules chaperonne dont 8 ***DnaJ*** et 3 ***Hsp70*** qui présentent une sous-expression. Les protéines ***DnaJ*** sont codées par de grandes familles de gènes. Elles interviennent dans le repliement, l'adressage et la renaturation des protéines et dans des voies multiples de transduction de signal (Miyata et Yahara, 1991 ; Xu et Lindquist, 1993 ; Kimura et *al.*, 1995). Les domaines J de plusieurs protéines DnaJ, peuvent interagir avec un domaine conservé de ***Hsp70***, modulant son activité ATPase (Langer et *al.*, 1992 ; Tsai et Douglas, 1996). Il est intéressant de noter que certaines de ces protéines peuvent former de grands complexes hétéro-oligomériques, qui se lient aux filaments d'actine en présence des calmodulines et servent ainsi de médiateur de voies spécifiques de transduction de signal (Nishida et *al.*, 1986 ; Kimura et *al.*, 1995). Ainsi, il a été suggéré que la protéine ***DnaJ*** codée par le gène *ARG1* intervient dans les voies de transduction de signal au cours de la réponse à la gravité (Sedbrook et *al.*, 1999 ; Chen et *al.*, 1999). On notera que ces gènes se trouvent induits au cours du stress hydrique chez le pin maritime (Costa et *al.*, 1999 ; Dubos et *al.*, 2003).

Nous avons identifié des gènes qui suggèrent que le calcium est un messager secondaire de la transduction du signal gravitropique. En effet, 4 **calmodulines** sont sur-exprimées et une **protéine de liaison dépendante du calcium** présente une sous-expression. Ces protéines sont capables de fixer des ions Ca^{2+} régulant ainsi la transmission du message et/ou l'activité de certaines enzymes. Le Ca^{2+} peut intervenir dans la transmission du signal *via* les calmodulines. Les calmodulines correspondent à une famille multigénique de protéines

de faible poids moléculaire. Une fois activées par le Ca^{2+}, les calmodulines vont à leur tour activer la transcription d'autres gènes. De par le grand nombre de gènes cibles de cette classe de protéines (McLaughlin et Wimmer, 1999) il semblerait que les calmodulines interviennent dans le contrôle d'une large gamme de réponses liées aux stimuli environnementaux (Snedden et Fromm, 1998). Plieth et Trewavas (2002) ont montré des changements transitoires de la concentration en Ca^{2+} au cours de la réorientation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* soumises à une inclinaison. Il a été montré aussi que la gravité semble induire une augmentation de la teneur en calcium libre dans le cytosol, accompagnée d'une variation de pH (Morita et Tasak, 2004). Des changements dans les concentrations en Ca^{2+} et en calmoduline dans le cytosol seraient donc capables de provoquer la transduction du signal et ainsi la croissance et le développement de la plante. Lu et Feldman (1997) ont suggéré que le Ca^{2+}/calmoduline-dépendant de la protéine kinase est impliqué dans la régulation du gravitropisme de la racine de maïs.

Nous avons identifié 3 ***MAPK*** (***Mitogen Activated Protein Kinase***), qui présentent une sous-expression suite à l'inclinaison. Les changements de l'activité ***MAPK*** se produisent dans le pulvinu de maïs en réponse à une stimulation gravitationnelle (Clore et *al.*, 2003). Ces protéines sont connues pour être d'importants médiateurs de la transduction de signal et elles sont impliquées dans une grande variété de processus physiologiques tels que la réponse aux stress environnementaux (Hirt, 1997).

Un facteur de transcription ***AUX/IAA*** induit par l'auxine est sur-exprimé au cours de l'inclinaison. Cette protéine a un rôle de régulation des gènes dont l'expression est auxine-dependante (Liscum et Reed, 2002). Moyle et *al.* (2002) ont observé que plusieurs gènes ***AUX/IAA*** sont sur-exprimés pendant la formation de la paroi secondaire chez un hybride aspen « *Populus trémula x trémuloïdes* » suite au stimulus gravitationnel, ce qui confirme notre étude. Au contraire, Andersson-Gunnera et *al.* (2006) ont montré une sous-expression de ***AUX/IAA*** suite à une stimulation gravitationnelle chez l'hybride « *Populus trémula x trémuloides* ». La différence entre notre observation et celle d'Andersson-Gunneras et *al.* (2006) peut l'expliquer par les différents temps d'application du stimulus gravitationnel : dans notre travail, une stimulation gravitationnelle précoce a été appliquée (45 min) et les tissus ont été prélevés avant la formation du bois de tension. En revanche, dans le cas d'Andersson-Gunneras et *al.* (2006), la stimulation gravitationnelle a été appliquée 11 jours et les tissus ont été prélevés après la formation du bois de tension. Cette différence est susceptible de refléter

l'importance de l'état physique et des processus liés au développement de l'organe dans la réponse gravitropique.

Par ailleurs, nous avons montré que 11 facteurs de transcription de type **Zinc-finger protein,** présentent une sur-expression au cours du stimulus gravitropique. Il a été montré que certains facteurs de transcription de ce type sont réprimés au cours du stress gravitationnel chez *Arabidopsis thaliana* (Kimbrough et *al.*, 2004).

Nous avons observé que 5 gènes codant pour des **sérine/thréonine protéine kinase** sont sous-exprimés et un gène codant pour une **sérine/thréonine/tyrosine protéine kinase** est sur-exprimé lors de l'inclinaison. Bien que ces protéines aient été déjà décrites comme étant impliquées dans la réponse aux stress hydrique et salin, la fonction de ces kinases n'a pas encore été définie (Yoon et *al.*, 1997). Cependant, Mikolajczyk et *al.* (2000) proposent que ces protéines puissent être impliquées dans la transduction de signal de stress chez les plantes.

Dix huit gènes impliqués dans la synthèse des protéines sont différentiellement exprimés suite à l'inclinaison, 12 d'entre eux sont sur-exprimés (deux ***60S protéines ribosomales L11***, une ***60S protéine ribosomale L44***, sept ***60S protéines ribosomales L26,*** et deux ***60S protéines ribosomales L36***) et 6 sous-exprimés (quatre ***protéine ribosomale S26***, et deux ***protéine ribosomale L37***). Au niveau protéique, Plomion et *al.* (2006) ont observé une diminution de plusieurs protéines ribosomales chez le peuplier suite à un stress hydrique.

Enfin, 13 gènes classés dans la catégorie « expression des gènes et des protéines », qui correspondent aux ubiquitines sont différentiellement exprimés après 45 min d'inclinaison. Les ubiquitines sont impliquées dans la dégradation des protéines. Parmi ces gènes, nous notons la présence de **26S protéasome** et **20S protéasome** qui présentent une sur-expression. Dans les cellules eucaryotes, ces protéines participent au contrôle de la transduction de signal en éliminant sélectivement les protéines de régulation. Le trafic intracellulaire et l'activité du protéasome se combinent pour contrôler la dégradation de PIN2 pendant le gravitropisme de la racine d'*Arabidopsis* (Abas et *al.*, 2006). Après une stimulation gravitationnelle, les variations protéasome-dépendantes de la localisation PIN2 et la dégradation sur les côtés supérieurs et inférieurs de la racine ont comme conséquence la distribution asymétrique de PIN2. L'ubiquitination de PIN2 se produit d'une façon protéasome-dépendante, indiquant que le protéasome est impliqué dans le contrôle de PIN2 (Abas et *al.*, 2006). Nous avons aussi

identifié 3 **ubiquitines ligase E3,** dont 2 présentent une sur-expression et une présente une sous-expression. Il y a plus de 1000 ubiquitines ligase E3 dans les plantes dont plusieurs ont été déjà caractérisées chez les eucaryotes. Récemment, certaines de ces enzymes E3 ont été impliquées dans des voies de signalisation spécifique chez les plantes (Schwechheimer et Villalobos, 2004). Deux **ubiquitine protéases spécifiques** (***UBP14***), présentent une sous-expression. Il a été montré que cette protéine joue un rôle essentiel pendant le développement précoce de la plante (Doelling et *al.*, 2001). Pendant ou après la dégradation des protéines cibles par le protéasome, les chaines d'ubiquitines sont libérées et plus tard désassemblées par les ubiquitine protéases spécifiques (***UBP14***) pour régénérer les monomères libres d'ubiquitines.

C.2 Cytosquelette

Divers composants du cytosquelette sont impliqués dans la réponse gravitropique, probablement *via* leurs interactions avec les amyloplastes (Sievers et *al.*, 1991 ; Baluska et Hasenstein, 1997). Cependant, le détail de la nature de cette interaction reste encore non résolu (Blancaflor, 2002 ; Yamamoto et Kiss, 2002).

Nous avons constaté que l'expression de 30 gènes appartenant à la catégorie fonctionnelle du cytosquelette est modifiée lors de l'inclinaison. Parmi ces gènes 13 codants pour des **profilines** et 1 gène codant pour une actine présentent une sur-expression. Quatre gènes codants pour des **ß-tubulines** présentent une sous-expression. Nous avons aussi identifié 12 gènes codants pour des **α-tubulines** dont 10 présentent une sur-expression et 2 une sous-expression. Bien que les tubulines en tant que composants des microtubules pourraient avoir un rôle dans un certain nombre de processus développementaux (Wasteneys, 2000 ; Wasteneys et Galway, 2003), les microtubules sont peu susceptibles d'être directement impliqués dans la perception de la gravité (Drobak et *al.*, 2004). En revanche, il a été montré que des filaments d'actine peuvent être impliqués dans le mouvement des organelles cellulaires (Hawes et Satiat-Jeunemaitre, 2001). Par exemple, les statolithes des rhizoïdes de *Chara* sont entourés par des protéines de myosine (myosin-like) (Braun et Wasteneys, 1998), et semblent être associés dans des filaments d'actine (Sievers et *al.*, 1989). Par ailleurs, la rupture de filaments d'actine dans la coiffe de la racine de maïs se traduit par une augmentation de sensibilité à la gravité, et les racines traitées montrent une forte réponse gravitropique (Hou et *al.*, 2003). En utilisant l'analyse microarray, Kimbrough et *al.* (2004)

ont montré que chez *Arabidopsis*, l'expression des gènes liés au cytosquelette diminue suite à une stimulation gravitationnelle. Ainsi, le cytosquelette semble nécessaire pour le mouvement des amyloplastes durant la stimulation gravitationnelle mais semble aussi être impliqué dans la transduction du signal conduisant à la courbure (Drobak et *al.*, 2004).

C.3 Paroi cellulaire

Suite à une stimulation gravitationnelle, la composition et l'extensibilité de la paroi cellulaire sont modifiées (Gibeaut et *al.*, 1990).

Cinquante huit gènes codant pour des protéines pariétales présentent une modification d'expression lors de l'inclinaison. Quarante huit de ces gènes correspondent à des protéines ***Arabinogalactan*** (***AGPs***) et présentent une sur-expression. Les ***AGPs,*** représentées par un grand nombre de protéines, interviendraient dans de nombreux processus biologiques. Ces gènes (***AGPs***) sont plus exprimés dans le bois de tension que dans le bois opposé (Déjardin et *al.*, 2004 ; Andersson-Gunneras et *al.*, 2006). L'expression de certains gènes ***AGPs*** spécifiquement dans le bois de tension, peut être liée aux propriétés mécaniques spécifiques du bois de tension (Lafarguette et *al.*, 2004). Nous avons confirmé la surexpression après inclinaison de certains gènes codant pour des AGPs par RT-PCR en temps réel (figure 18). Les gènes étudiés sont PopFLA4, 5, 7 et 15, ce qui corrobore les résultats obtenus par Lafarguette et *al.* (2004), excepté PopFLA15 qui s'est avéré non régulé. La différence entre notre observation et celle de Lafarguette et *al.* (2004) pour PopFLA15 peut s'expliquer par les différents temps d'application du stimulus gravitationnel et les différents stades de développement de l'organe étudié.

Parmi les 58 gènes pariétaux dont l'expression est modifiée lors de l'inclinaison six gènes codant pour des ***Cellulose synthase***, présentent une sous-expression, dont 3 PttCesA2 ont un rôle dans la synthèse de la paroi secondaire (Samuga et Joshi, 2002) et 3 PttCesA7 ont un rôle dans la synthèse de la paroi primaire (Samuga et Joshi, 2004). La cellulose synthase est impliquée dans la voie de biosynthèse de la cellulose (Doblin et *al.*, 2002). La diminution des transcrits de ce gène a été également observée chez le pin maritime suite un stress hydrique (Dubos, 2001). Les analyses d'expression ont suggéré que certaines cellulose synthase ont un rôle dans la synthèse de la paroi secondaire, alors que d'autres sont importantes pour la synthèse de la paroi primaire (Pear et *al.*, 1996 ; Gardiner et *al.*, 2003 ;

Burton et *al.*, 2004). Aspeborg (2004) a montré par une approche microarray que les gènes codant pour quatre des isoenzymes putatives de cellulose synthase, PttCesA1, PttCesA3-1, PttCesA3-2, et PttCesA9, sont sur-exprimés pendant la différentiation du xylème de peuplier alors que l'expression des autres gènes de ***cellulose synthase*** reste stable (Aspeborg, 2004).

Enfin, 4 gènes codant pour des ***glycosyl transférase***, sont sous-exprimés dans les tiges inclinées. Les ***glycosyl transférases*** sont impliquées dans la polymérisation des polysaccharides, elles transfèrent un ose d'un sucre diphosphonucléosidique sur une molécule donnée (Ridley et *al.*, 2001). Ce résultat a aussi été confirmé par Andersson-Gunnera et *al.* (2006) en utilisant des peupliers hybride aspen « *Populus trémula x trémuloides* ». La diminution de l'abondance des transcrits de glycosyl transférases pendant la formation du bois de tension suggère leur intervention dans la biosynthèse d'hémicellulose, qui diminue dans le bois de tension (Timell, 1969).

C.4 Métabolisme des carbohydrates

Vingt et un gènes faisant partie de cette catégorie fonctionnelle présentent une sous-expression lors du stress gravitropique, parmi lesquels 11 codent pour des ***dTDP-glucose 4-6-dehydratases***, 4 codent pour des ***UDP-glucose 4-épimérases***, 2 codent pour des ***glycine hydroxyméthyltransférases***, 2 codent pour une ***glycoside hydrolase***, et enfin 2 gènes codent pour des ***phosphoglucomutases***.

Les gènes ***dTDP-glucose 4-6-dehydratase*** et ***UDP-glucose 4-épimérase***, interviennent vraisemblablement dans la biosynthèse de la cellulose et la formation de la paroi cellulaire. L***'UDP-glucose 4-épimérase*** catalyse la transformation de l'UDP-glucose en UDP-galactose qui est la forme active du glucose incorporé dans les chaines d'hémicellulose (Zablackis et *al.*, 1995). Il a été suggéré que les monolignols sont glycosylés pour faciliter le transport à travers la membrane, puis déglycosylés par des ***glycoside hydrolases*** avant leur polymérisation dans la paroi cellulaire (Boerjan et *al.*, 2003). La ***glycine hydroxyméthyltransférase*** (***GHMT***) est une enzyme clé dans le métabolisme du carbone (Besson et *al.*, 1995), et catalyse la conversion réversible de glycine et 5, 10-méthylènetétrahydrofolate en sérine et tétrahydrofolate. Au niveau protéique, Vander Mijnsbrugge et *al.* (2000) ont identifié cette protéine dans le jeune xylème de peuplier. La

diminution de l'accumulation de cette protéine est en accord avec les données observées dans l'analyse protéomique chez *Arabidopsis* pour un stress gravitationnel (Kamada et *al.*, 2005).

C.5 Biosynthèse de la lignine

Le bois de tension du peuplier est caractérisé par une faible teneur en lignine et hémicellulose (Andersson-Gunneras et *al.*, 2006). De nombreuses études ont montré la répression des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, et plus particulièrement dans la biosynthèse des monolignols, notamment chez *Populus* (Andersson-Gunneras et *al.*, 2006). Ces observations sont en accord avec les données que nous avons obtenues sur le transcriptome. En effet, nous avons identifié 34 gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines, dont 30 sous-exprimés et 4 sur-exprimés. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la sous-expression de gènes associés à la voie de biosynthèse des lignines et de gènes codant pour des enzymes intervenant dans leur polymérisation est probablement associée à la teneur plus faible en lignine dans le bois de tension.

Nous avons aussi observé que six gènes intervenant dans la glycolyse ***Glyceraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase*** (***G3PDH***) présentent une sous-expression suite à la stimulation gravitationnelle. Cette ***G3PDH*** est sur-exprimée pendant la formation du bois comprimé de pin maritime (Le-Provost, 2003).

Le transfert de groupement méthyle sur différents types de substrats semble jouer un rôle central dans la régulation des différentes voies métaboliques, notamment en condition de stress gravitropique. En effet, nous avons observé la sous-expression de six ***s-adénosylméthyonine décarboxylases*** (***SAM***). Cette enzyme est sur-exprimée dans le bois opposé de pin maritime exposé à un stimulus gravitationnel (Le-Provost, 2003). Deux autres enzymes (S-adénosyl méthionine) impliquées dans ce métabolisme ont été identifiées par Costa (1999).

C.6 Autres métabolismes

Vingt quatre gènes classés dans la catégorie métabolisme des acides aminés, présentent une sous-expression suite à l'inclinaison. Ainsi, la ***3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase*** intervient probablement dans la voie shikimate (Weaver et

Herrmann, 1997). La lignine est un composé phénolique synthétisé à partir de la phénylalanine *via* la voie shikimate. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la sous-expression de gènes codant pour des enzymes de la voie shikimate est associée à la teneur plus faible en lignine dans le bois de tension. Les ***aminopeptidases*** constituent un ensemble divers de peptidases avec des rôles importants dans l'entretien, la croissance, le développement, et la défense de la cellule. Les ***aminopeptidases*** sont considérées comme des enzymes omniprésentes avec des rôles de maintien de l'homéostasie cellulaire. Dans cette catégorie l'expression de neuf gènes codant pour des ***méthionine synthase II*** (***cobalamin-indépendant***) est modifiée par l'inclinaison. Cette protéine catalyse la synthèse de la méthionine par un transfert direct du groupement méthyle de N^5-méthyltétrahydrofolate à l'atome de soufre de l'homocystéine. Deux ***glutamine synthases*** sont sous-exprimées au cours de l'inclinaison. Andersson-Gunneras et *al.*, (2006) ont mis en évidence chez le peuplier la diminution d'un transcrit ***glutamine synthase*** dans le bois de tension au cours du stress gravitationnel. Nous avons aussi observé des variations au niveau du métabolisme nucléotidique (diminution de l'expression de 2 ***Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin***), et lipidique (diminution de l'expression d'une ***Aspartyl protease***).

Neuf gènes ont été classés dans la catégorie énergie qui correspond au métabolisme primaire. Parmi ces gènes nous notons la présence d'une ***H^+-ATPase*** et de huit ***F0F1-ATPase*** qui présentent une sous-expression. La régulation des différentes voies métaboliques au sein de la cellule passe par la régulation du pH des différents compartiments cellulaires et par la production d'énergie *via* la synthèse d'ATP. Ainsi, la sous-expression au niveau transcriptionnel des gènes codant pour des ATPases, pourrait être due à la diminution de la production de l'ATP par la phosphorylation. En utilisant l'analyse microarray et protéique, il a été montré que l'expression des gènes codant pour des ATPases diminue au cours du stress gravitationnnel chez *Arabidopsis* (Kimbrough et *al.*, 2004 ; Kamada et *al.*, 2005).

C.7 Réponse au stress, croissance, et transport

Dix sept gènes classés dans la catégorie fonctionnelle "réponse au stress", sont différentiellement exprimés lors de l'inclinaison. Parmi ces gènes, 12 codant pour des ***Déhydrines*** (***Dhn1***), présentent une sur-expression au cours du stress. Trois gènes codant pour une ***Annexine*** et deux codant pour une ***protéine 14-3-3***, présentent une sous-expression au cours du stress. L'expression de la ***Dhn1*** est modifiée par la secheresse. En effet, Plomion

et *al.* (2006) ont montré une forte accumulation de cette protéine au cours du stress hydrique chez le peuplier. La ***déhydrine*** est induite par d'autres stress environnementaux tels que, le froid et la salinité (Yuxiu et *al.*, 2007).

Une stimulation mécanique effectuée sur un entre-noeud jeune de *Bryonia dioica* provoque une délocalisation très rapide des ***annexines*** du cytosol vers les membranes, 30 minutes après la stimulation (Thonat, 1996). Thonat a suggéré que la protéine ***annexine*** intervient dans la médiation du signal calcique à la suite d'un stimulus mécanique. Clark et *al.* (2000) ont montré qu'avant la stimulation gravitationnelle la plus forte concentration des ***annexines*** sont orientées vers la direction de la gravité le long des cellules. En revanche, 15 et 30 min après une stimulation gravitationnelle les ***annexines*** sont distribuées tout autour de la cellule et plus distinctement le périphérique cellulaire. Ces données suggèrent qu'il existe une corrélation entre la gravité et la distribution des ***annexines*** dans les cellules de plantes à fleurs.

Les ***protéines 14-3-3*** sont une famille de protéines régulatrices. Elles sont conservées et ubiquitairement exprimées dans les cellules eucaryotes. Elles sont capables de se lier et de réguler des protéines de signalisation fonctionnellement différentes telles que des kinases, des phosphatases, des récepteurs transmembranaires. Cette abondance de protéines cibles permet à la ***protéine 14-3-3*** de jouer des rôles importants dans de nombreux processus régulateurs vitaux comme la transduction des signaux (Subramanian et Masters, 2000).

Parmi les 42 gènes intervenant dans le transport dont l'expression est modifiée lors de l'inclinaison, 18 gènes sont sur-exprimés et 25 gènes sont sous-exprimés. Notamment, 10 de ces gènes codant pour des ***aquaporines***, présentent une sous-expression au cours du stress gravitationnel. Récemment, il a été montré que le potentiel osmotique est transitoirement diminué du côté gravistimulé chez le riz et que la courbure gravitropique est empêchée par des inhibiteurs connus des ***aquaporines*** (Hu et *al.*, 2007). Ces données suggèrent que la stimulation gravitationnelle pourrait affecter l'influx d'eau *via* les ***aquaporines***, conduisant ainsi à la courbure de l'organe.

La sur-expression d'un gène codant pour une ***protéine de transfert du phosphatidylinositol*** (***SEC14***), au cours de l'inclinaison est en accord avec les travaux de Perera et *al.* (2006) qui montrent que l'inositol 1, 4, 5-triphosphate pourrait être impliqué dans la perception de la gravité. Cette protéine ***SEC14*** très conservée, règlerait divers évènements

de signalisation par l'intermédiaire de lipides. Elle joue un rôle dans la signalisation au cours du développement des plantes (Routt et Bankaitis, 2004).

Parmi les 8 gènes intervenant dans le mécanisme d'import nucléaire, 6 codant pour une protéine ***RANBP1*** (***Ran-binding protein***) et deux codant pour un ***NTF2*** (***facteur de transport nucléaire***), présentent une sur-expression au cours du stress gravitationnel. La protéine ***RANBP1*** fournit de l'énergie et le ***NTF2***, quant à lui est responsable du transport de ***RANBP1*** de part et d'autre du NPC (nuclear pore complex) pour permettre le renouvellement du cycle d'import (Van Impe et *al.*, 2008).

Deux gènes appartenant à la famille des transporteurs de métaux (***NRAMP***), présentent une sous-expression au cours du stress. La ***NRAMP*** présente une similarité avec la protéine ***EIN2*** (Alonso et *al.*, 1999) qui pourrait jouer un rôle régulateur dans la voie de la réponse à l'éthylène (Chen et *al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré qu'un niveau élevé de l'éthylène régule négativement le gravitropisme de la racine d'*Arabidopsis* (Buer et *al.*, 2006).

C.8 Protéines inconnues et hypothétiques

Vingt sept pour cent (27%) des gènes régulés lors de l'inclinaison correspondent soit à des protéines inconnues soit à des protéines hypothétiques. Il est possible que ces gènes aient des fonctions spécifiques aux arbres. Ils peuvent aussi correspondre à des transcrits qui n'ont pas encore été annotés, bien que le génome du peuplier soit totalement séquencé (Tuskan et *al.*, 2006).

L'analyse transcriptomique présentée dans ce mémoire, bien que réalisée sur une puce ne contenant pas l'ensemble des gènes du peuplier, montre que la réponse de la plante lors de l'inclinaison est complexe. Cette réponse implique en effet de nombreuses voies métaboliques. Le suivi simultané de ces voies métaboliques et des réseaux de régulation des gènes, serait nécessaire pour réaliser une analyse dynamique du fonctionnement de la plante.

D. Comparaison transcriptome/protéome

Les analyses transcriptomiques montrent que l'expression d'un grand nombre de gènes est modifiée par l'inclinaison. L'analyse comparée des résultats des approches transcriptomique et protéomique obtenus pour la partie basale suite à 45 min d'inclinaison, ne peut se faire que sur 5 protéines/gènes. Les variations d'expression de ces gènes et protéines sont divergentes. En effet, l'analyse transcriptomique montre une diminution de l'expression de l'ATPase, F0F1 ATPase, EFα1 et une augmentation de l'accumulation des transcrits de l'actine et SEC14. Au contraire, l'analyse protéomique montre une augmentation de l'ATPase. Les quantités des protéines F0F1 ATPase et actine ne varient pas significativement. Le spot correspondant à EFα1 et SEC14 n'est pas détecté après inclinaison. Il a été montré que les quantités de transcrits et de protéines, ne sont pas toujours corrélées (Gygi et *al.*, 1999). L'étude de l'expression des protéines permet de prendre en compte aussi bien le contrôle post-transcriptionnel que les modifications post-traductionnelles.

Conclusions et perspectives générales

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

Ce travail, qui concerne la réponse gravitropique de jeunes plants de peuplier à une stimulation gravitationnelle montre que le redressement du peuplier implique un processus de courbure lié à la différentiation du bois de réaction dans les zones en croissance secondaire et un processus de courbure locale lié à une élongation différentielle dans les zones en croissance primaire. Nous avons montré que la réponse morphologique de la région basale est distincte de celle de la région apicale (figure 2, article). La région basale a développé le bois de tension une semaine après l'inclinaison, alors que la région apicale est réorientée 24h après l'inclinaison. Ceci implique que les processus liés au développement de la région basale et apicale de la plante sont ainsi différents.

Dans les arbres le mécanisme de la perception de la gravité pourrait faire intervenir les amyloplastes. Nous avons montré que les amyloplastes sont présents à la base des cellules de "l'endoderme". Le redressement est corrélé avec la sédimentation des amyloplastes à la base des cellules de "l'endoderme" (Nakamura et *al.* 2001). Des interrogations subsistent sur le rôle des amyloplastes : doivent-ils entrer en interaction avec certains composants cellulaires tels que le RE, ou bien les amyloplastes créent ils des tensions dans le cytosquelette qui sont transmises à la membrane plasmique. Il est possible que la sédimentation des amyloplastes dans les cellules endodermiques conduise à la formation du xylème secondaire et à l'excentricité de la moelle de la tige.

Nous avons étudié la variation du protéome de tige de peuplier. Nous avons montré qu'une stimulation gravitationnelle induit différentes voies métaboliques et de signalisation dans chaque région de la tige inclinée 45 min ou une semaine. Notre approche a montré que l'expression de protéines n'est pas identique dans la région apicale et basale. Ceci suggère que les événements moléculaires conduisant à la réorientation de la tige sont différents selon le stade de développement de l'organe. Probablement, chaque partie de la plante reçoit et répond différemment au signal. La majeure partie des protéines de fonctions connues que nous avons identifiées au cours de l'inclinaison, correspondent à des protéines décrites comme étant affectées par des stress biotiques ou abiotiques. Les messagers secondaires connus pour être impliqués dans la transduction du signal gravitropique comme IP3, Ca^{2+}, NDP-kinase, et le cytosquelette pourraient être directement ou indirectement impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Nos résultats et les données de la bibliographie suggèrent que

la sensibilité des tiges à l'inclinaison pourrait être due à la sédimentation des amyloplastes, à des contacts entre les amyloplastes et les éléments du cytosquelette et des méchanorecepteurs sur la membrane plasmique. Il semble que les amyloplastes sont attachés aux filaments d'actine qui sont eux même reliés à la membrane plasmique. Les mouvements des amyloplastes produiraient des tensions sur les filaments d'actine. Ces tensions se propageraient le long du filament jusqu'à la membrane produisant ainsi l'activation des canaux ioniques. On peut supposer que les canaux ioniques activés situés dans la membrane plasmique sont responsables de la transduction du signal gravité. Ils pourraient être stimulés par l'action des amyloplastes sur les éléments du cytosquelette reliés à des méchanorecepteurs. Dans le futur nous prévoyons d'analyser l'expression de certaines protéines impliquées dans la transduction du signal gravité que nous avons mis en évidence ici, dans différents tissus suivant l'inclinaison, en utilisant les techniques de western blot et d'immunolocalisations *in situ*. Notre étude a porté sur la partie entière apicale et basale de la tige. Nous envisageons de la compléter par la comparaison de l'accumulation des protéines du côté supérieur de la tige à celle du côté inférieur.

La détermination de la distribution tissulaire et de la localisation cellulaire des Trx végétales au cours du stress peut apporter des indications sur leur rôle dans la réponse gravitropique. Nous avons montré que les 2 protéines Trx h1 et Trx h2 sont retrouvées dans les cellules parenchymateuses des régions apicale et basale de la tige au niveau des amyloplastes et que la Trx h1 est exprimée spécifiquement dans les deux régions une semaine après l'inclinaison. Cette détection au niveau des amyloplastes suggère que la Trx pourrait avoir des protéines cibles au niveau de l'enveloppe des amyloplastes. Il serait donc intéressant de chercher les cibles des thioredoxines h dans les amyloplastes en utilisant une approche protéomique. Nous disposons pour cette étude de diverses Trx h cytosolique de peuplier et d'une de leur réductase spécifique, la NADPH-thioredoxine reductase (NTR). Les extraits protéiques seront incubés en présence de chacune des Trx h (préalablement réduite par la NTR) puis les thiols apparus sous l'effet de la réduction seront marqués par un composé radioactif. Les protéines seront ensuite séparées par 2ED et celles ayant incorporé la radioactivité seront identifiées par spectrométrie de masse.

Le suivi en cinétique de certaines protéines (OEE1, OEE2, Cu-Zn SOD, POCCH, APX, ATPase, SAMs et Trx) différentiellement exprimées et potentiellement régulées par la thioredoxine et participant à la production des molécules de signalisation EAO (espèces

activées de l'oxygène) montre une accumulation de transcrits variable entre les régions apicale et basale de tige inclinée. Nous avons également montré que l'inclinaison induit des changements d'expression rapides et transitoires. Ainsi, les différences d'accumulation des transcrits entre les deux régions (Figure 19) suggèrent que la réponse à la gravité implique des voies de signalisations spécifiques de chaque région. Une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de l'EAO est obtenue dans la racine après une stimulation gravitationnelle (Joo et *al.* 2001). Il serait intéressant de piéger les formes réactives de l'oxygène (EAO) par des antioxydants (par exemple : N-acétylcystéine, acide ascorbique, et Trolox), chez les plantes inclinées, afin de mieux comprendre leur rôle dans la réponse gravitropique.

L'analyse transcriptomique nous a montré que plusieurs gènes sont sur-ou sous-exprimées 45 min après l'inclinaison. Parmi ces gènes, certains ont été préalablement identifiés dans la graviperception, tels que les gènes codant pour la calmoduline (Sinclair et *al.*, 1996), protéine de liaison dépendante du calciume (Björkman et Cleland, 1991), protéine de transfère phosphatidylinositole (SEC14) (Perera et *al.*, 2006), MAPK (Clore et *al.*, 2003), AUX/IAA (Bennett et *al.*, 1996), et l'actine (Yamamoto et Kiss, 2002). En outre, notre analyse a révélé de nombreux gènes qui n'ont pas été précédemment associés à la réponse induite par la gravité, tels que les gènes codant pour Ran-binding protein, un Sérine/thréonine protéine kinase, G-protein, et déhydrine. Dans le futur, nous prévoyons de nous focaliser sur des groupes de gènes spécifiques que nous avons mis en évidence ici dans le but de déterminer leur rôle précis dans le gravitropisme. Par exemple, l'analyse du transcriptome suggère qu'il pourrait être fructueux d'étudier le rôle des PopFLAs, glycosyltransférases et la lignification dans la réponse gravitropique. Le futur travail pourrait se concentrer sur la dynamique de l'expression de ces gènes en examinant l'abondance des transcrits pendant une cinétique. Il serait également intéressant d'examiner la fonction de ces gènes durant la formation du bois de tension au cours du stress en utilisant des peupliers transgéniques modifiés pour l'expression de ces gènes. En outre, le suivi des gènes pour lesquels l'abondance des transcrits a augmenté ou diminué en réponse à l'inclinaison fournit des points de départ utiles pour identifier les composantes de signalisation impliquées dans la perception et la transduction du signal gravité dans les plantes ligneuses.

Les analyses du transcriptome et du protéome nous ont permis de donner une vision globale des différentes voies métaboliques impliquées dans la réponse gravitropique et la

formation du bois de tension. Les gènes et les protéines identifiés par ces deux types d'approches serviront de point de départ dans l'étude fonctionnelle des gènes impliqués dans la graviperception et la formation du bois de tension. Nous pouvons nous concentrer par exemple sur la voie de biosynthèse de la lignine, de la paroi cellulaire. De plus, les approches menées au niveau du transcriptome et du protéome pourraient être complétées par une description plus intégrée de l'évolution qualitative et quantitative des métabolites synthétisés dans les tissus inclinés et non inclinés de manière à saisir l'ensemble du réseau métabolique et de pouvoir caractériser la fonction des gènes.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wisniewska J., Moulinier-Anzola JC., Sieberer T., Frimland J., Luschnig C. (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. Nature cell biology **8**: 249-256.

Adessi C., Miège C., Albrieux C., Rabilloud T. (1997) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. Electrophoresis **18**: 127-135.

Aharoni A., Keizer LC., Bouwmeester HJ., Sun Z., Alvarez-Huerta M., Verhoeven HA., Blaas J., Van Houwelingen AM., De Vos RC., Van Der Voet H., Jansen RC., Guis M., Mol J., Davis RW., Schena M., van Tunen AJ., O'connell AP. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. Plant Cell **12**: 647-662.

Alonso JM., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S., Ecker JR. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science **284**: 2148-2152.

Andersson A., Keskitalo J., Sjodin A., Bhalerao R., Sterky F., Wissel K., Tandre K., Aspeborg H., Moyle R., Ohmiya Y., Bhalerao R., Brunner A., Gustafsson P., Karlsson J., Lundeberg J., Nilsson O., Sandberg G., Strauss S., Sundberg B., Uhlen M., Jansson S., Nilsson P. (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. Genome Biology **5**: R24.

Andersson-Gunneras S., Hellgren JM., Björklund S., Reagan S., Moritz T., Sundberg B. (2003) Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravtationnal induction of tension wood. The Plant Journal **34**: 339-349.

Andersson-Gunneras S., Mellerowicz EJ., Love J., Segerman B., Ohmiya Y., Coutinho PM., Nilsson P., Henrissat B., Moritz T., Sundberg B. (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in Populus: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. The Plant Journal **45**: 144-165.

Appel RD., Palagi PM., Walther D., Vargas JR., Sanchez JC., Ravier F., Pasquali C., Hochstrasser DF. (1997) Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. Electrophoresis **18**:2724-34.

Aspeborg H. (2004) Discovery of fiber-active enzymes in *Populus wood*. Thesis of Royal Institute of Technology Department of Biotechnology Stockholm. pp 38.

B

Ballicora MA., Frueauf JB., Fu Y., Schurmann P., Preiss J. (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. J Biol Chem **275**: 1315-1320.

Balmer Y., Vensel WH., Cai N., Manieri W., Schürmann P., Hurkman WJ., Buchanan BB. (2006) A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **103**: 2988-2993.

Balmer Y., Vensel WH., Tanaka CK., Hurkman WJ., Gelhaye E., Rouhier N., Jacquot JP., Manieri W., Shurmann P., Droux M., Buchanan BB. (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA **101**: 2642-2647.

Baluska F., Hasenstein KH. (1997) Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. Planta Suppl **203**: S69-S78.

Bennett MJ., Marchant A., Green HG., May ST., Ward SP., Millner PA., Walker AR., Schulz B., Feldmann KA. (1996) Arabidopsis *aux1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. Science **273**: 948-950.

Besson V., Neuburger M., Rébeillé F., Douce R. (1995) Evidence for three serine hydroxylmethyltransferases in green leaf cells. Purifcation and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms. Plant Physiol Biochem **33**: 665-673.

Bjellqvist B., Sanchez JC., Pasquali C., Ravier F., Paquet N., Frutiger S., Hughes GJ., Hoch-strasser DF. (1993) Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. Electrophoresis **14**: 1375-1378.

Björkman T., **Cleland RE.** (1991) The role extracellular free calcium gradients in gravitropic signaling in maize roots. Planta **185**: 379-384.

Blancaflor EB. (2002) The cytoskeleton and gravitropism in higher plants. Journal of Plant Growth regulation **21**: 120-136.

Blum H., Beier H., Gross H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**: 93-99.

Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003) Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology **54**: 519-546.

Bohler S., Bagard M., Oufir M., Planchon S., Hoffmann L., Jolivet Y., Hausman J-F., Dizengremel P., Renaut J. (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. Proteomics **7**: 1584-1599.

Boonsirichai K., Sedbrook J., Chen R., Gilroy S., Masson P. (2003) ARG1 is peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalinisation and lateral auxin transport in plant statocytes. Plant Cell **15**: 2612-2625.

Bradshaw HD. Jr., Villar M., Watson BD., Otto KG., Stewart S., Stettler RF. (1994) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. **89**: 167-178.

Braun M., Wasteneys GO. (1998) Reorganization of the actin and microtubule cytoskeleton throughout blue-light-induced differentiation of characean protonemata into multicellular thalli. Protoplasma **202**: 38-53.

Brookes PS., Pinner A., Ramachandran A., Coward L., Barnes S., Kim H., Darley-Usmar VM. (2002) High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: A tool for functional proteomics of mitochondria and signalling complexes. Proteomics **2**: 969-977.

Buchanan BB., Balmer Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. Annu Rev Plant Biol **56**: 187-220.

Buchen B., Braun M., Hejnowicz Z., Sievers A. (1993) Statoliths pull on microfilaments. Protoplasma **172**: 38-42.

Buer CS., Sukumar P., Muday GK. (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of *Arabidopsis*. Plant Physiology **140**: 1384-1396.

Burton RA., Shirley NJ., King BJ., Harvey AJ., Fincher GB. (2004) The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. Plant Physiology **134**: 224-236.

C

Cervera M-T., Storme V., Ivens B., Gusmão J., Liu BH., Hostyn V., Van Slycken J., Van Montagu M., Boerjan W. (2001) Dense genetic linkage maps of three Populus species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on Amplified Fragment Length Polymorphism and Microsatellite Markers. Genetics **158**: 787-809.

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

Chang SC., Cho MH., Kim S-K., Lee JS., Kirakosyan A., Kaufman PB. (2003) Changes in phosphorylation of 50 and 53 kDa soluble proteins in graviresponding oat (*Avena Sativa*) shoots. Journal of Experimental Botany **384**: 1013-1022.

Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T., Masson PH. (1998) The *Arabidopsis thaliana agravitropic 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. Proc Natl Acad Sci USA, **95**: 15112-15117.

Chen R., Rosen E., Masson PH. (1999) Gravitropism in higher plants. Plant Physiology **120**: 343-350.

Chen Y-F., Etheridge N., Schaller GE. (2005) Ethylene Signal Transduction. Annals of Botany **95**: 901-915.

Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis **19**: 1901-1909.

Cholodny N. (1927) Wuchshormone und tropismen bie den pflanzen. *Biologische Zwntralblatt* **47**: 604-629.

Clair B., Alméras T., Sugiyama J. (2006) Compression stress in opposite wood of angiosperms: observations in chestnut, mani and poplar. Ann. For. Sci **63**: 507-510.

Clark GB., Rafati DS., Bolton RJ., Dauwalder M., Roux SJ. (2000) Redistribution of annexin in gravistimulated *pea plumules*. Biochemistry **38**: 937-947.

Clore AM., Turner WS., Morse AM., Whetten RW. (2003) Changes in *mitogen-activated protein kinase* activating occur in the maize pulvinus in response to gravistimulation and are important for the binding response. Plant, Cell & environment **26**: 991-1001.

Corthals GL., Wasinger VC., Hochstrasser DF., Sanchez JC. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. Electrophoresis **21**: 1104-1115.

Costa P., Pionneau C., Bauw G., Dubos C., Bahrman N., Kremer A., Frigerio J-M., Plomion C. (1999) Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. Electrophoresis **20**: 1098-1108.

Coutand C., Fournier M., Moulia B. (2007) The Gravitropic Response of Poplar Trunks: Key Roles of Prestressed Wood Regulation and the Relative Kinetics of Cambial Growth versus Wood Maturation. Plant Physiology **144**: 1166-1180.

D

Déjardin A., Leplé JC., Lesage-Descauses MC., Costa G., Pilate G. (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues – a comparative analysis from multiple libraries. Plant Biol. **6**: 55-64.

Del Pozo JC., Timpte C., Tan S., Callis J., Estelle M. (1998) The ubiquitin-related RUB1 and auxin Response in *Arabidopsis*. Science **280**: 1760-1763.

Desprez T., Amselem J., Caboche M., Hofte H. (1998) Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA array. Plant J. **14**: 643-652.

Doblin MS., Kurek I., Jacob-Wilk D., Delmer DP. (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. Plant and Cell Physiology **43**: 1407-1420.

Doelling JH., Yan N., Kurepa J., Walker J., Vierstra RD. (2001) The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **27**: 393-405.

Drobak BK., Franklin-Tong VE., Staiger CJ. (2004) The role of the actin cytoskeleton in plant cell signalling. New Phytologist **163**: 13-30.

Driss-Ecole D., Perbal G. (1999) Movements of statocyte organelles in microgravity. In: Biorack on Spacelab, ESA SP-1222 ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands. In press

Dubos C. (2001) Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique. Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy-I pp 180.

Dubos C., Le Provost G., Pot D., Salin F., Lalane C., Madur D., Frigerio JM., Plomion C. (2003) Identification and characterization of water-deficitresponsive genes in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings. Tree Physiol. **23**:169-179.

E

Ecknewalder JE. (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD Jr, Heilman PE., Hinckley TM., eds. *Biology of Populusand its Implications for Management and Conservation.* Ottawa, Canada: NRC Research Press, National research Council of Canada, 7-32.

Eng JK., McCormick AL., Yates JR. (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. J. Am. Soc. Mass Spectrom **5**: 976-989.

Ephritikhine G., Barbier-Brygoo H., Muller J., Guern J. (1987) Auxin effect on the transmembrane potential difference of wild-type and mutant tobacco protoplasts exhibiting a differential sensitivity to auxin. Plant Physiol. **83**: 801-804.

Ettlinger C., and Lehle L. (1988) Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. Nature **331**:176-178.

Evans ML., Ishikawa H. (1997) Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots. Planta Suppl **203**: S115-S122.

F

Fasano JM., Swanson SJ., Blancaflor EB., Dowd PE., Kao TH., Gilroy S. (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. Plant Cell **13**: 907-921.

Faurobert M., Mihr C., Bertin N., Pawlowski T., Negroni L., Sommerer N., Causse M. (2007) Majore proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. Plant Physiology **143**: 1327-1346.

Fiorani Celedon PA., de Andrade A., Xavier Meireles KG., da Cruz Gallo de Carvalho MC., Gomes Caldas DG., Henry Moon D., Tozelli Carneiro R., Franceschini LM., Oda S., Labate CA. (2007) Proteomic analysis of the cambial region in juvenile Eucalyptus grandis at three ages. Proteomics **7**: 2258-2274.

Fisher JB., Mueller RJ. (1983) Reaction anatomy and reorientation in leaning stems of balsa (*Ochroma*) and papaya (*Carica*). Canadian journal of botany **61**: 880-887.

Fisher JB., Stevenson JW. (1981) Occurrence of reaction wood in branches of dicotyledons and its role in tree architecture. Botanical Gazette **142**: 82-95.

Fournier M., Baillères H., Chanson B. (1994) Tree biomechanics : growth, cumulative prestresses and re-orientations. Biomimetics **2** : 229-251.

Frewen BE., Chen THH., Howe GT., Davis J., Rohde A., Boerjan W., Bradshaw HD Jr. (2000) Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. Genetics **154**: 837-845.

Friml J., Wistniewska J., Benkova E., Mendgen K., Palme K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Nature **415**: 806-809.

Fukaki H., Wysocka-Diller J., Kato T., Fujisawa H., Benfey PN., Tasaka M. (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **14**: 425-430.

G

Gai X., Lal S., Xing L., Brendel V., Walbot V. (2000) Gene discovery using the maize genome database ZmDB. Nucleic Acids Res. **28**: 94-96.

Gardiner JC., Taylor NG., Turner SR. (2003) Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. Plant Cell **15**: 1740-1748.

Garin J., Ferro M., Rolland N., Joyard J. (2001) Stratégies en protéomique: *outils, limites et développement*. Ecole thématique Biologie végétale 1-9.

Gavin AC., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick JM., Michon AM., Cruciat CM., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier MA., Copley RR., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G., Superti-Furga G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature **415**: 141-147.

Gharahdaghi F., Weinberg CR., Meagher DA., Imai BS., Mische SM. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis 20: 601-605.

Gibeaut DM., Karuppiah N., Chang SR., Brock TG., Vadlamudi B., Kim D., Ghosheh NS., Rayle DL., Carpita NC., Kaufman PB. (1990) Cell wall and enzyme changes during the graviresponse of leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). Plant Physiology **94**: 411-416.

Gion JM., Lalanne C., Le Provost G., Ferry-Dumazet H., Paiva J., Chaumeil P., Frigerio J-M., Brach J., Barré A., de Daruvar A., Claverol S., Bonneu M., Sommerer N., Negroni L., Plomion C. (2005) The proteome of maritime pine wood forming tissue. Proteomics **5**: 3731-3751.

Godovac-Zimmermann J., Brown LR. (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. Mass Spectrometry Reviews **20**: 1-57.

Goff SA., Ricke D., Lan TH., et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). Science **296**: 92-100.

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Csordas A., Diaz JJ., Madjar JJ. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. Electrophoresis **18**: 328-337.

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis **21**: 1037-53.

Greenbaum D., Jansen R., Gerstein M. (2002) Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. Bioinformatics **18**: 585-96
.

Guilfoyle TJ., Ulmasov T., Hagen G. (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. Cell Mol Life Sci **54**: 619-627.

Gygi SP., Rochon Y., Franza BR., Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol **19**: 1720-1730.

H

Haga K., Lino M. (2006) Asymmetric distribution of auxin correlates with gravitropism and phototropism but not with autostraightening (autotropism) in pea epicotyls. Journal of Experimental Botany **57**: 837-847.

Han K-H., Gordon MP., Strauss SH. (1997) High-frequency transformation of cottonwoods (genus *Populus*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Can. J. For. Res. **27**: 464-470.

Han K-H., Meilan R., Ma C., Strauss SH. (2000) An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). Plant Cell Rep. **19**: 315-320.

Hanash SM., Strahler JR., Neel JV., Hailat N., Melham R., Keim D., Zhu C., Wagner D., Gage DA., Watson JT. (1991) Highly resolving two-dimensional gels for protein sequencing. Proc Natl Acad Sci USA, **88**: 5709-5713.

Hari V. (1981) A method for the two-dimensional electrophoresis of leaf proteins. Anal. Biochem. **113**: 332-335.

Hawes CR., Satiat-Jeunemaitre B. (2001) Trekking along the the cytoskeleton. Plant Physiology **125**: 119-122.

Hejnowicz Z. (1967) Some observations on the mechanism of orientation movement of woody stems. American Journal of Botany **54**: 684-689.

Hellgren JM., Olofsson K., Sundberg B. (2004) Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. Plant Physiology **135**: 212-220.

Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomqvist K., Bhalerao R., Uhlen M., Teeri TT., Lundeberg J., Sundberg B., Nilsson P., Sandberg G. (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, **98**: 14732-14737.

Hirt H. (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. Trend in plant Science **2**: 11-15.

Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader GD., Moore L., Adams SL., Millar A., Taylor P., Bennett K., boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskat B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems AR., Sassi H., Nielsen PA., Rasmussen KJ., Andersen JR., Johansen LE., Hansen LH., Jespersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sorensen BD., Matthiesen J., Hendrickson RC., Gleeson F., Pawson T., Moran MF., Durocher D., Mann M., Hogue CW., Figeys D., Tyers M. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. Nature **415**: 180-180.

Hobbi LJ. (1998) Auxin: molecular genetic approaches in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem. **36**: 91-102.

Hou G., Mohamalawari DR., Blancaflor EB. (2003) Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. Plant Physiology **131**: 1360-1373.

Hu L., Cui D., Neill S., Cai W. (2007) *OsEXPA4* and *OsRWC3* are involved in asymmetric growth during gravitropic binding of rice leaf sheath bases. Physiologia Plantarum **130**: 560-571.

Hu X., Neill SJ., Tang Z., Cai W. (2005) Nitric Oxide Mediates Gravitropic Bending in Soybean Roots. Plant Physiology **137**: 663-670.

Hunt DF., Yates JR. 3rd, Shabanowitz J., Winston S., Hauer CR. (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA, **83**: 6233-7.

I

Ideker T., Thorsson V., Ranish JA., Christmas R., Buhler J., Eng JK., Bumgarner J., Goodlette DR., Aebersold R., Hood L. (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. Science **292**: 929-934.

Ischikawa H., Evans ML. (1993) The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. Plant Physiology **102**: 1203-1210.

Ishiwatari Y., Honda C., Kawashima I., Nakamura S., Hirano H., Mori S., Fujiwara T., Hayashi H., Chino M. (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. Planta **195**: 456-463.

J

Joo JH., Bae YS. Lee JS. (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. Plant Physiol. **126**: 1055-1060.

Jones AM., Im K-H., Savka MA., Wu M-J., DeWitt NG., Shillito R., Binns AN. (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein1. Science **282**: 1114-1117.

Jones AM. (1994) Auxin-binding proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **45**: 393-420.

Jorrín JV., Maldonado AM., Castillejo MA. (2007) Pant proteome analysis: A 2006 update. Proteomics **7**: 0000-0000.

Jourez B., Avella-Shaw T. (2003) Effet de la durée d'application d'un stimulus gravitationnel sur la formation de bois de tension et de bois opposé dans de jeunes pousses de peuplier (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). Ann. For. Sci. **60**: 31-41.

Jourez B., Vaianopoulos C., Hébert J. (2003) Effet de l'intensité d'un stimulus gravitationnel induit artificiellement sur la croissance et la formation du bois de tension dans de jeunes pousses de peuplier (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). Ann. For. Sci. **60**: 789-802.

K

Kamada M., Higashitani A., Ishioka N. (2005) Proteomic analysis of *Arabidopsis* root gravitropism. Biol. Sci. Space **19**: 148-154.

Kato T., Morita MT., Fukaki H., Yamauchi Y., Uehara M., Niihama M., Tasaka M. (2002) SGR2, a phospholipase-like protein and ZIG/SGR4, a SNARE are involved in shoot gravitropism of Arabidopsis. Plant Cell **14**: 33-46.

Kehoe DM., Villand P., Somerville S. (1999) DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. Trends Plant Science **4**: 38-41.

Kerr K. (2003) Design Considerations for Efficient and Effective Microarray Studies. Biometrics **59**: 822-828.

Kim M-S., Klopfenstein NB., Chun YW. (1997) *Agrobacterium*- mediated transformation of *Populus* species. In: N.B. Klopfenstein, Y.W. Chun, M.-S. Kim and M.R. Ahuja (Eds.) Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of *Populus* (General Technical Report RM-GTR-297), Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins, USA, pp. 51-59.

Kimbrough JM., Salinas-Mondragon R., Boss WF., Brown CS., Sederoff HW. (2004) The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. Plant Physiology **136**: 2790-2805.

Kimura Y., Yahara I., Lindquist S. (1995) Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways. Science **268**: 1362-1365.

Kiss JZ., Guisinger MM., Miller AJ., Stackhouse KS. (1997) Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology **38**: 518-525.

Kiss JZ., Sack FD. (1989) Reduced gravitropic sensitivity in roots of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. Planta **180**: 123-130.

Kiss JZ., Wright JB., Caspar T. (1996) Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of Arabidopsis. Physiologia Plantarum **97**: 237-244.

Klopfenstein NB., Chun YW., Kim M-S., Ahuja MR (1997) Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of *Populus* (General Technical Report RM-GTR-297), Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Fort Collins, USA.

Klose J. (1995) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik **26**: 231-243.

Kobrehel K., Wong JH., Balogh A., Kiss F., Yee BC., Buchanan BB. (1992) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *h*. Plant Physiology **99**: 919-924.

Kohler A., Delaruelle C., Martin D., Encelot N., Martin F. (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. FEBS Letters **542**: 37-41.

Koller A., Washburn MP., Lange BM., Andon NL., Deciu C., Haynes PA., Hays L., Schiltez D., Ulaszek R., Wei J., Wolters D., Yates JR. (2002) Proteomics survey of metabolic pathways in rice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **99**: 11969-11974.

Kussmann M., Lassing U., Sturmer CA., Przybylski M., Roepstorff P. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation. J Mass Spectrom **32**: 483-493.

L

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

Lahm HW., Langen H. (2000) Masse spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. Electrophoresis **21**: 2105-2114.

Langer T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer MK., Hartl F-U. (1992) Successive action of dnaK, dnaJ, and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. Nature **356**: 683-689.

Lauriere M., Bouchez I., Doyen C., Eynard L. (1996) Identification of glycosylated forms of wheat storage proteins using two-dimensional electrophoresis and blotting. Electrophoresis **17**: 497-501.

Lee JS., Mulkey TJ., Evans ML. (1983) Reversible loss of gravitropic sensitivity in maize roots after tip application of calcium chelators. Science 220: 1375-1376.

Legué V., Blancaflor E., Wymer C., Perbal G., Fantin D., Gilroy S. (1997) Cytoplasmic free Ca2+ in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. Plant Physiology **114**: 789-800.

Leplé JC., Déjardin A., Laurans F., Pilate G., Goué N., Label P., Beritognolo I., Boizot N., Breton C. (2004) Le peuplier à l'ère génomique. Biofutur **247**: p43.

Le-Provost G. (2003) Effet de la saison et d'un stress mécanique sur la variation du transcriptome dans le xylème en formation chez le pin maritime (*Pinus pinaster Ait.)*. Thèse de l'Université Bordeaux I.

Leyser HMO., Pickett FB., Dharmasiri S., Estelle M. (1996) Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. Plant J. **10**: 403-413.

Link AJ., Eng J., Schieltz DM., Carmack E., Mize GJ., Morris DR., Garvik BM., Yates JR. (1999) Direct analysis of proteins complexes using mass spectrometry. Nat. Biotech. **17**:676-682.

Liscum E., Reed JW. (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Mol Biol **49**: 387-400.

Little CHA., Savidge RA. (1987) The role of the plant growth regulators in forest tree cambial growth. Plant Growth Regul. **6**: 137-169.

Livak KJ., Schmittgen TD. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods **25**: 402-408.

Lockhart DJ., Winzeler EA. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature **405**: 827-836.

Locquin M., Langeron YM. (1978) Manual de Microscopia. Masson, Paris.

Lu YT., Feldman FJ. (1997) Light-regulated root gravitropism; a role for, and characterization of, a calcium/calmodulindependent protein kinase homolog. Planta **203:** S91–S97.

M

Mann M., Pandey A. (2001) Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence database. Trends Biochem. Sci. **26**: 54-61.

Marchand C., Le Marechal P., Meyer Y., Miginiac-Maslow M., Issakidis-Bourguet E., Decottignies P. (2004) New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. Proteomics **4**: 2696-2706.

Marengo E., Robotti E., Antonucci F., Cecconi D., Campostrini N., Righetti PG. (2005) Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. Proteomics **5**: 654-666.

Martin F., Kohler A. (2004) Le peuplier à l'ère génomique. Biofutur **247**: p38.

Martin-Magniette M.L., Robin S. (2004) Techniques statistique pour l'analyse du transcriptome, informatique pour l'analyse du transcriptome, Boulicaunt JF, Gandrillon O. Eds, Hermès.

Masson PH. (1995) Root gravitropism. BioEssays **17**: 119-127.

Matsuo T., Seyama Y. (2000) Introduction to modern biological mass spectrometry. J. Mass Spectrom **35**: 114-30.

McLaughlin SB., Wimmer R. (1999) Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. New Phytologist **142**: 373-417.

Mihr C., Braun H-P. (2003) in: Conn, P.M. (Ed.), Handbook of Proteomic Methods, Humana Press, New Jersey, PP. 409-416.

Mijnsbrugge KV., Meyermans H., Montagu MV., Bauw G., Boerjan W. (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. Planta **210**: 589-598.

Mikkelsen R., Mutenda KE., Mant A., Schürmann P., Blennow A. (2005) a-Glucan, water dikinase (GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, **102**: 1785-1790.

Mikolajczyk M., Awotunde OS., Muszynska G., Klessig DF., Dobrowolska G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. Plant Cell **12**: 165-178.

Miyata Y., Yahara I. (1991) Cytoplasmic 8S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. J Biol Chem **266**: 8779-8783.

Moctezuma E., Feldman LJ. (1999) The Role of Amyloplasts during gravity perception in gynophores of the peanut plant (*Arachis hypogaea*). Annals of Botan **84**: 709-714.

Modolell J., Cabrer B., Vazquez D. (1973) The interaction of elongation factor G with *N*-Acetylphenylalanyl transfer RNA ribosome complexes. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, **70**: 3561-3565.

Moore I. (2002) Gravitropism: Lateral Thinking in Auxin Transport. Current Biology **12**: R452-R454.

Morita MT., Kato T., Nagafusa K., Saito C., Ueda T., Nakano A., Tasaka M. (2002) Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in Arabidopsis. Plant Cell **14**: 47-56.

Morita MT., Tasaka M. (2004) Gravity sensing and signalling. Curr. Opin. Plant Biol. **7**: 1-7.

Mortez E., Krogh TN., Vorum H., Gorg A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. Proteomics **1**: 1359-1363.

Moulia B. (2007) Biomécanique adaptative de la croissance et du déploiement spatial des végétaux. Habilitation à diriger des recherches auprès de l'Université Balise Pascal. p60.

Moulia B., Coutand C., Lenne C. (2006) Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants. Consequences for the biomechanical modelling of plant architecture. Am. J. Bot. **93**: 1317-1329.

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

Müller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K. (1998) *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. EMBO J **17**: 6903-6911.

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum **15**: 473-492.

N

Nakamura T., Negishi Y., Funada R., Yamada M. (2001) Sedimentable amyloplasts in starch sheath cells of woody stems of Japanese Cherry. Adv. Space Res. 27: 957960.

Nijtmans LG., Henderson NS., Holt IJ. (2002) Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. Methods **26**: 327-334.

Nishida E., Koyasu S., Sakai H., Yahara I. (1986) Calmodulinregulated binding of the 90-kDa heat shock protein to actin filaments. J Biol Chem **261**: 16033-16036.

O

O'Farrell P. (1975) High resolution of 2-dimension electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**: 4007-21.

Oda Y., Huang K., Cross FR., Cowburn D., Chait BT. (1999) Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **96**: 6591-6596.

Ong SE., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen DB., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. Mol. Cell Proeomics **13**: 376-386.

P

Pandey A., Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. Nature **405**: 837-46.

Patterson SD. (2000) Proteomics: the industrialization of protein chemistry. Current Opinion in Biotechnology **11**: 413-418.

Pear JR., Kawagoe Y., Schreckengost WE., Delmer DP., Stalker DM. (1996) Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 12637-12642.

Peltier JB., Frisco G., Kalume DE., Roepstorff P., Nilsson F., Adamska I., van Dijck KJ. (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. Plant Cell **12**: 319-341.

Perbal G., Driss-Ecole D., Tewinkel M., Volkmann D. (1997) Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity. Planta **203**: S57-S62.

Perera IY., Heilmann I., Boss WF. (1999) Transient and sustained increases in inosital-1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. Proc Natl Acad Sci USA, **96**: 5838-5843.

Perera IY., Heilmann I., Chang SC., Boss WF., Kaufman PB. (2001) A role for inosital-1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of Oat shoot pulvini. Plant Physiology **125**: 1499-1507.

Perera IY., Hung CY., Brady S., Muday GK., Boss, WF. (2006) A universal role for inositol 1,4,5 trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. Plant Physiology **140**: 746-760.

Pionneau C., Dubos C., Costa P., Lalanne C., Madure D., Gion J-M., Bahrman N., Plomion C. (1998) Electrophorèse Bidimensionnelle des Proteins. INRA de Pierroton P. 1-51. www.inra.pierroton.fr.

Plieth C, Trwavas AJ. (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiology **129**: 786-796.

Plomion C., Lalanne C., Claverol S., Meddour H., Kohler A., Bogeat-Triboulot BB., Barre A., Le Provost G., Dumazet H., Jacob D., Bastien C., Dreyer E., de Daruvar A., Guehl J-M., Schmitter J-M., Martin F., Bonneu M. (2006) Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. Proteomics **6**: 6509-6527.

Plomion C., Pionneau C., Brach J., Costa P., Baillères H. (2000) Compression wood-responsive proteins in developing xylem of martime pine (*Pinus Pinaster* Ait.). Plant Physiology **123**: 959-969.

R

Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis **18**: 307-316.

Rabilloud T., Charmont S. (2000) Proteome research: two-dimensional electrophoresis and identification methods. In Rabilloud T. ED. Springer, Berlin, Heidelberg, New york: 107-26.

Rabilloud T., Kieffer S., Procaccio V., Louwagie M., Courchesne PL., Patterson SD., Martinez P., Garin J., Lunardi J. (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. Electrophoresis **19**: 1006-1014.

Rabilloud T., Strub J-M., Luche S., van Dorsselaer A., Lunardi J. (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. Proteomics **1**: 699-704.

Ramagli LS., Rodriguez LV. (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Electrophoresis **6**: 559-563.

Ranjeva R., Graziana A., Mazars C. (1999) Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. The FASEB journal **13**: S135-S141.

Richmond T., Somerville S. (2000) Chasing the dream: plant EST microarrays. Curr. Opin. Plant Biol. **3**: 108-116.

Ridley BL., O'Neill MA., Mohnen DA. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturoniderelated signaling. Phytochemistry **57**: 929-967.

Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., Seraphin B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat. Biotechnol. **17**: 1030-1032.

Rosen E., Chen R., Masson PH. (1999) Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus? Trends in plant science **10**: 407-412.

Rosengren AT., Salmi JM., Aittokallio T., Westerhom J., Lahesmaa R., Nyman TA., Nevalainen OS. (2003) Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. Proteomics **3**: 1936-1946.

Rossignol M. (2001) Analysis of the plant proteome. Curr. Opin. Biotech. **12**: 131-134.

Rossignol M., Peltier J-B., Mock H-P., Matros A., Maldonado AM., Jorrín JV. (2006) Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. Proteomics **6**: 5529-5548.

Routt SM., Bankaitis VA. (2004) Biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins. Review: Biochem. Cell Biol. **82**: 254-262.

Ruan Y., Gilmore J., Conner T. (1998) Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarray. Plant J. **15**: 821-833.

S

Sack FD. (1997) Plastids and gravitropic sensing. Planta 203: S63-S68.

Sack, FD. (1991) Plant gravity sensing. International Review of Cytology **127**: 193-252.

Samuga A., Joshi C.P (2002) Anew cellulose synthase gene (*PtrCesA2*) from aspen xylem is orthologous to Arabidopsis AtCesA7 (irx3) gene associated with secondary cell wall synthesis. Gene **297**: 37-44.

Samuga A., Joshi C.P (2004) Differential expression patterns of two now primary cell wall-related cellulose synthase cDNAs, PtrCesA6 and PtrCesA7 from aspen trees. Gene **334**: 73-82.

Santoni V., Rouquié D., Doumas P., Mansion M., Boutry M., Degand H., Duprée P., Packman L., Sherrier J., Prime T., Bauw G., Posada E., Rouzé P., Dehais P., Sahnoun I., Barlier I., Rossignol M. (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. Plant J. **16**: 633-641.

Schena M., Shalon D., Davis RW., Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science **270**: 467-470.

Schenk PM., Kazan K., Wilson I., Anderson JP., Richmond T., Somerville SC., Manners JM. (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, **97**: 11655-11660.

Schnabl H. (2002) Gravistimulated effects in plants in: Horneck, G., Christa Baumstark-Khan, C. (Eds.), *Astrobiology. The quest for the conditions of life. Physics and astronomy online library,* Springer, Berlin pp. 297 -313.

Schwechheimer C., Villalobos LI. (2004) Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. Curr. Opin. Plant Biol. **7**: 677-686.

Schweitzer B., Kingsmore SF. (2002) Measuring proteins on microarrays. Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 14-19.

Scott AC., Allen NS. (1999) Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. Plant Physiology **121**: 1291-1298.

Sedbrook JC., Chen R., Masson PH. (1999) ARG1 (Altered Response to Gravity) encodes a novel DnaJ-like protein which potentially interacts with the cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci USA, **96**: 1140-1145.

Shevchenko A., Schaft D., Roguev A., Pijnappel WW., Stewart AF. (2002) Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective. Mol. Cell Proteomics **1**: 204-212.

Sievers A., Krus S., Kuo-Huang L., Wendt M. (1989) Statoliths and microfilaments in plant cells. Planta **179**: 275-278.

Sievers A., Buchen B., Volkmann D., Hejnowicz Z. (1991) Role of the cytoskeleton in gravity perception. *In* CW Lloyd, ed, The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press, London.

Sinclair W., Olivier I., Maher P., Trewavas A. (1996) The role of calmodulin in the gravitropic response of the Arabidopsis thaliana agr-3 mutant. Planta **199**: 343-351.

Silady RA., Kato T., Lukowitz W., Sieber P., Tasaka M., Somerville CR. (2004) The *gravitropism defective* 2 mutants of Arabidopsis are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. Plant Physiology **136**: 3095-3103.

Smith CM., Rodriguez-Buey M., Karlsson J., Campbell MM. (2004) The response of the poplar transcriptome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. New phytologist **164**: 123-136.

Snedden WA., Fromm H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. Trends Plant Science **3**: 299-304.

Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

Sperling K. (2001) From proteomics to genomics. Electrophoresis **14**: 2835-7.

Staves MP., Wayne R., Leopold AC. (1997) Cytochalasin D does not inhibit gravitropism in roots. Am J Bot **84**: 1530-1535.

Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villarroel R., VanMontagu M., Sandberg G., Olsson O., Teeri TT., Boerjan W., Gustafsson P., Uhlén M., Sundberg B., Lundeberg J. (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **95**: 13330-13335.

Stinemetz CL., Hasenstein KH., Young LM., Evans LM. (1992) Effect of calmodulin antagonists on the growth and graviresponsiveness of primary roots of maize. Plant Growth Reg 11: 419-427.

Subramanian H.F.R., Masters S.C. (2000) 14-3-3 proteins: Structure, Function, and Regulation. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. **40**: 617-647.

Swatzell LJ., Edelmann RE., Makaroff CA., Kiss JZ. (1999) Integrin-like proteins are localized to plasma membrane fractions, not plastids, in *Arabidopsis*. Plant Cell physiol **40**: 173-183.

T

Tasaka M., Kato T., Fukaki H. (1999) The endodermis and shoot gravitropism. Trends in Plant Science **4**: 103-107.

Telewski FW., Jaffe MJ. (1986) Thigmomorphogenesis: the role of ethylene in the response of *Pinus taeda* and *Abies fraseri* to mechanical perturbation. Physiologia Plantarum **66**: 227-233.

Thompson JE., Hopkins MT., Taylor C., Wang T-W. (2004) Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. Trends Plant Science **9**: 174-179.

Thonat C. (1996) Thigmomorphogenèse de la Bryone: intervention du calcium et des annexines dans la transduction d'un signal mécanique. Thèse de l'Université Clermont-Ferrand 2.

Timell TE. (1969) The chemical composition of tension wood. Sven papperstidn **72**: 173-181.

Tsai J., Douglas MG. (1996) A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for *YDJ1* stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. J Biol Chem **271**: 9347-9354.

Tuskan GA., Difazio S., Jansson S., et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science **313**: 1596-1604.

U

Utsuno K., Shikanai T., Yamada Y., Hashimoto T. (1998) *AGR*, an *Agravitropic* locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. Plant Cell Physiol **39**: 1111-1118.

V

Vander Mijnsbrugge K., Meyermans H., Van Montagu M., Bauw G., Boerjan W. (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. Planta 210: 589-598.

Van Impe K., Hubert T., De Corte V., Vanloo B., Boucherie C., Vandekerckhove J., Gettemans J. (2008) A New Role for Nuclear Transport Factor 2 and Ran: Nuclear Import of CapG. Traffic **9**: 695-707.

Vestal ML. (1990) In *Methods in Enzymol*. Review **193**: 46-50.

Volkman D., Behrens HM., Sievers A. (1986) Development and gravity sensing of cress under microgravity. Naturwissenschaften. **73**: 438-441.

Volkman D., Buchen B., Hejnowicz Z., Tewinkel M., Sievers A. (1991) Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets. Planta **185**: 153-161.

Volkman D., Baluska F. (2000) Actin cytoskeleton related to gravisensing in higher plants. In: Staiger C., Baluska F., Volkmann D., Barlow PW., editors. Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p 557-571.

W

Washburn MP., Ulaszek R., Deciu C., Schietltz DM., Yates JR. (2002) Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. Anal. Chem. **74**: 1650-1657.

Wasteneys GO. (2000) The cytoskeleton and growth polarity. Current opinion in plant biology **3**: 503-511.

Wasteneys GO., Galway ME. (2003) Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. Annu Rev Plant Biol **54**: 691-722.

Wayne R., Staves MP. (1996) A down to earth model of gravisensing or Newton's law of gravitation from the apple's perspective. Physiologia plantarum **98**: 917-921.

Wayne R., Staves MP., Leopold AC. (1990) Gravity-dependent polarity of cytoplasmic streaming in *Nitellopsis*. Protoplasma **155**: 43-57.

Weaver LM., Herramann KM. (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. Trends in Plant Science **2**: 346-351.

Wendt UK., Wenderoth I., Tegeler A., Schaewen AV. (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). The Plant Journal **23**: 723-733.

Went FW., Thimann KV. (1937) Phytohormones (Macmillan, New York).

Wilkins MR. (1997) Gooley AA. Protein identification in proteome project. In : Wilkins MR, Williams KL, Appel, RD Hochstrasser DF, eds. *Proteome Research : New Frontiers in Functional Genomics*. Berlin : Springer-Verlag: 35-64.

Wilkins MR., Gasteiger E., Sanchez JC., Bairoch A., Hochstrasser DF. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. Electrophoresis **19**: 1501-1505.

Wilkins MR., Sanchez JC., Gooley AA., Appel RD., Humphery-Smith I., Hochstrasser DF., Williams KL. (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **13**: 19-50.

Wisman E., Ohlrogge J. (2000) *Arabidopsis* microarray service facilities. Plant Physiology **124**: 1468-1471.

Wolters DA., Washburn MP., Yaters JR. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal. Chem. **73**: 5683-5690.

Wu R., Bradshaw HD Jr., Stettler RF. (1997). Molecular genetics of growth and development in *Populus* (Salicaceae). V. Mapping quantitative trait loci affecting leaf variation. Am. J. Bot. **84**: 143-153.

Wu R., Stettler RF. (1994) Quantitative genetics of growth and development in *Populus*. I. A three-generation comparison of tree architecture during the first 2 years of growth. Theor. Appl. Genet. **89**: 1046-1054.

Wunsch C., Volkmann D. (1993) immunocytological detection of myosin in the root tip cells of *Lepidium sativum* L. Eur J Cell Biol Suppl **61**: 46

Wyatt SE., Rashotte AM., Shipp MJ., Robertson D., Muday GK. (2002) Mutations in the gravity persistence signal loci in *Arabidopsis* disrupt the perception and/or signal transduction of gravitropic stimuli. Plant Physiology **130**: 1426-1435.

X

Xu Y., Lindquist S. (1993) Heat-shock protein hsp90 governs the activity of $pp60^{v\text{-}src}$ kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 7074-7078.

Y

Yamamoto K., Kiss JZ. (2002) Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of Arabidopsis. Plant Physiology **128**: 669-681.

Yamamoto M., Yamamoto KT. (1998) Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. Plant Cell Physiol **39**: 660-664.

Yamauchi Y., Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. (1997) Mutations in the *SGR4*, *SGR5*, and *SGR6* loci of *Arabidopsis thaliana* alter the shoot gravitropism. Plant Cell Physiol **38**: 530-535.

Yan JX., Wait R., Berkelman T., Harry RA., Westbrook JA., Wheeler CH., Dunn MJ. (2000) A modified silver staining prortocole for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. Electrophoresis **21**: 3666-3672.

Yang Y., Dutoit S., Luu P., Lin D., Peng V., Ngaii J., Speed T. (2002) Normalization for cDNA microarray data : a composite method addressing single and multiple slide systematic variation . Nucleic Acids Research, vol. **30**.

Yano D., Sato M., Saito C., Sato MH., Morita MT., Tasaka M. (2003) A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for Arabidopsis shoot gravitropism. Proc Natl Acad Sci USA, **100**: 8589-8594.

Yates JR., 3rd (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. J Mass Spectrom **33**: 1-19.

Yin TM., Huang MR., Wang MX., Zhu LH., He P., Zhai WX. (1999) RAPD linkage mapping in a *Populus adenopoda* × *P. alba* F-1 family. Acta Bot. Sin. **41**: 956-961.

Yoon HW., Kim MC., Shin PG., Kim JS., Lee SY., Hwang I., Bahk JD., Hong JC., Han C., Cho MJ. (1997) Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. Mol. Gen. Genet **255**: 359-371.

Yuxiu Z., Zi W., Jin X. (2007) Molecular mechanism of dehydrin in response to environmental stress in plant. Progress in Natural Science **17**: 237-246.

Z

Zablackis E., Huang J., Muller B., Darvill AG., Albersheim P. (1995) Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Physiology **107**: 1129-38.

Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bidlingmaier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean RA., Gerstein M., Snyder M. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. Science **293**: 2101-2105.

Zivy M., Joyard J., Rossignol M. (2004) La protéomique et ses applications à la biologie végétale. La génomique en biologie végétale: p.183-208.

Annexes

Annexe 1

MURACHIGE AND SKOOG

PREPARATION DES SOLUTIONS MERES (les stocker au frigo à 4°C après stérilisation)

Macro-éléments (10x) dans 1000 ml

NH_4NO_3	nitrate d'ammonium	16.5 g
KNO_3	nitrate de potassium	19 g
$CaCl_2,2H_2O$	chlorure de calcium	4.4 g
$MgSO_4,7H_2O$	sulfate de magnésium	3.7 g
KH_2PO_4	phosphate de potassium	1.7 g

Autoclaver la solution 20 min à 120°C

Prendre 100 ml de solution finale par litre de milieu

Vitamines B (100x) dans 500 ml

Acide nicotinique	50 mg
Pyridoxine hydrochloride	50 mg
Thiamine hydrochloride	50 mg
Panththénate de calcium	50 mg
L-cystéine chlorydrate	50 mg
Biotine (5mg/50ml) se dissout dans NaOH	5 ml

Stériliser la solution par filtration unité à vis pour membrane ø 47 mm.

Prendre 10 ml de solution finale par litre de milieu

Oligo-éléments (1000x) dans 100 ml

H3BO3 : acide borique	620 mg
$MnSO_4,H_2O$: sulfate de manganèse	1690 mg
$ZnSO_4,7H_2O$: sulfate de zinc	1060 mg
KI : iodure de potassium	83 mg
$Na_2MoO_4,2H_2O$: molybdate de sodium	25 mg
$CuSO_4,5H_2O$: sulfate de cuivre	2.5 mg
$CoCl_2,6H_2O$: chlorure decobalt	2.5 mg
Ou $CoCl_2$	1.36 mg

Autoclaver la solution 20 min à 120°C

Prendre 1 ml de solution finale par litre de milieu

Fer (préparation dans 500 ml)

Ethylendiaminetetra-acetic acid ferric 2 g

Monosodium salt

Autoclaver la solution 20 min à 120°C

Prendre 10 ml de solution finale par litre de milieu

Myo-inositol (100x) dans 500 ml

Préparation à 100 mg/l

Peser 5 g

Autoclaver 20 min à 120°C

Prendre 10 ml de solution finale par 1litre de milieu

L-glutamine (100x) dans 500 ml

Préparation à 200 mg/l

Peser 10 g

Stériliser la solution par filtration unité à vis pour membrane ø 47 mm.

Prendre 10 ml de solution finale pour 1litre de milieu

PREPARATION MURASHIGE ET SKOOG AU ½ (1000 ml)

Multiplication végétative du peuplier

Macro-éléments	50 ml
Oligo-éléments	1 ml
Vitamines	10 ml
Fer	10 ml
Myo-inositol	10 ml
L-glutamine	10 ml
Saccharose	20 g

Compléter à 1000 ml en rajoutant 910 ml d'eau distillée

Ajuster le pH entre pH = 5.9-6

Agar 7 g

Répartir 10 ml par tube ou 120 ml/bocal

Autoclaver 20 min à 120°C

Annexe 2

Solution nutritive (peuplier)

Macro-éléments : (préparer une solution par sel)

	Sol. n°	Sel	Quantité		Stockage
-	1	NaCl	10	g/l	T° ambiante
-	2	$Mg\ SO_4\ 7H_2O$	270	g/l	4°C
-	3	$(NH_4)_2\ SO_4$	72.5	g/l	4°C
-	4	$Ca\ (NO_3)_2$	345	g/l	4°C
-	5	$K\ NO_3$	202	g/l	T° ambiante
-	6a	$K_2\ H\ PO_4$	192	g/l	T° ambiante
-	6a	$K\ H_2\ PO_4$	150	g/l	4°C

Prendre 10 ml de chaque solution pour 20 L de solution finale.

Micro-éléments : (Préparer une unique solution de 200 ml, stocker à 4°C)

-	$Mo\ O_4\ (NH4)_2$	100	mg
-	$Mn\ SO_4\ H_2O$	610	mg
-	$Zn\ SO_4\ 7\ H_2O$	880	mg
-	$H_3\ BO_3$	560	mg
-	$Cu\ SO_4\ 5\ H2O$	196	mg

Mascolate de fer (2%) : 2 ml pour 20 L

Prendre 4 ml de cette solution pour 20 L de solution finale

Annexe 3

Extraction des ARNs totaux (d'après Chand et al., 1993**)**

Extraction d'ARN totaux à partir de 200 mg de matériel végétal.

Broyer dans de l'azote liquide (ou prendre poudre à -80°C).

Transvaser le broyat dans tube eppendorf 2 ml : il faut qu'il y a moins d'1/3 du tube rempli.

Ajouter 1 ml tampon d'extraction (température ambiante ; en prépare 40 à 50 ml).

Vortexer vigoureusement.

Incuber 5 min à 65°C.

Laisser 1 min à température ambiante.

Extraire des acides nucléiques avec 1 volume (1 ml) de chloroforme-isoamylique (24 :1).

Centrifuger 14 000 rpm, 20 min à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un tube eppendorf 2 ml.

Renouveler l'opération avec 1 volume (1 ml) de chloroforme-isoamylique (24 :1).

Centrifuger 14 000 rpm, 10 min à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un tube eppendorf 1.5 ml.

Calibrer le volume final à 1 ml avec de l'eau "RNAse Free".

Précipiter les ARNtx par 250 µl de LiCl 10 M (1/4 V → 2 M final), vortexer vigoureusement et incuber la nuit à 4°C.

Centrifuger 14 000 rpm, 45 min à 4°C.

Laver 2 fois avec éthanol 70% ; centrifuger 14 000 rpm, 5 min à 4°C et bien mélanger.

Sécher le culot 10 min dans la glace ou 2 à 3 min à température ambiante.

Solubiliser doucement le culot dans 25 µl d'eau "RNAse Free".

Purifier les acides nucléiques avec 500 µl de tampon SSTE.

Extraire les acides nucléiques avec 1 volume de chloroforme-isoamylique (24 :1).

Centrifuger 14 000 rpm, 10 min à 4°C.

Précipiter les ARNtx 1 ml éthanol 100% (2V), 2h à -20°C (ou 20 min à -80°C).

Centrifuger 14 000 rpm, 45 min à 4°C.

Laver 3 fois par éthanol 70%, centrifuger 14 000 rpm, 5 min à 4°C.

Sécher le culot 10 min dans la glace ou 2 à 3 min à température ambiante.

Solubiliser le culot dans 20 à 50 µl d'eau "RNAse Free".

Doser les ARNtx avec le NanoDrop (ND-100), et visualiser sur gel agarose 1.5% (dépôt de 1 µg) migration 150 V, révélation BET.

Stocker les ARNtx à -80°C.

Tampon d'extraction

CTAB 2% (p/v)
PVP 2%
Tris-HCl pH8 100 mM
EDTA pH8 25 mM
NaCl 2 M
Dissoudre le tout dans de H_2O up en chauffant. Mélanger et autoclaver.
Ajouter 2% de Béta-mercaptoéthanol juste avant utilisation ;
Pour 500 ml de tampon :

- dissoudre 10 g de PVP dans 300 ml de H_2O up en chauffant et en agitant,
- ajouter 10 g de CTAB, dissoudre en continuant de chauffer et d'agiter,
- ajouter 50 ml de tris-HCl pH8 1 M et 25 ml d'EDTA pH8 0.5 M,
- ajouter enfin les 58.44 g de NaCl,
- ajuster le volume à 500 ml avec de H_2O up.

Tampon SSTE

NaCl 1 M
SDS 0.5%
Tris-HCl pH8 10 mM
EDTA pH8 1 mM

Annexe 4

Purification du ADNc pour microarray

NB: toutes les centrifugations sont éffectuées à 10000g à temperature ambiante.
Vérifier que l'H_2O est à 55°C, que l'éthanol a bien été ajouté au tampon de lavage et que l'ADNc binding buffer n'est pas précipité, s'il l'est, chauffer le 10 min à 37°C afin de dissoudre le précipité et refroidir à température ambiante avant utilisation.

- ajouter 250 µl d'ADNc binding buffer à chaque échantillon et bien mélanger, centrifuger brièvement 2 sec et transférer sur la colonne de filtration
- Centrifuger environ 1 min à 10000g
- Eliminer le filtrat
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage
- Centrifuger 1 min à 10000g
- Eliminer le surnageant et centrifuger de nouveau 1 min pour enlever toute trace de tampon
- Transférer la colonne de filtration sur un tube d'élution
- Ajouter 9 µl d'H_2O préchauffée à 55°C au centre de la colonne
- Laisser 2 min à température ambiante puis centrifuger environ 1.5 min à 10000g
- Eluer de nouveau avec 9 µl d'H_2O préchaufée
- Vérifier le volume élué et si besoin le compléter à 14 µl avec de l'eau RNase free
- L'ADNc contenu dans environ 14 µl peut-être congelé à -20°C

Purification du ARN amplifié pour microarray

Préchauffer H_2O nuclease free pendant au moins 10 min à 55°C

- Ajouter à chaque (IVT master) échantillon 350 µl d'ARNa binding buffer
- Ajouter 250 µl déthanol 100% et mélanger par pipetage 3 fois
- Transférer sur une colonne de filtration
- Centrifuger 1 min à 10000g jusqu'à que le mélange passe à travers le filtre
- Ajouter 650 µl de tampon de lavage
- Centrifuger 1 min à 10000g
- Eliminer le surnageant et centrifuger de nouveau 1 min pour enlever toute trace
- Transférer la colonne sur un nouveau tube
- Eluer avec 100 µl d'H2O préchauffée à 55°C ; laisser 2 min à température ambiante
- Centrifuger 1.5 min à 10000g
- Prendre 2 µl pour estimer la concentration des échantillons à l'aide du Nanodrop
- Prélever 2 µg d'ARNa pour une analyse sur gel
- Aliquoter 10 µg d'ARNa par tube en vue de la lyophilisation
- Congeler les échantillons à -20°C pour la nuit ou à -80°C pour des durées plus longues.

Préparation d'un IVT (*In Vitro transcription*) master mix

- 3 µl aaUTP (50mM)
- 12 µl ATP, CTP, GTP mix (25mM)
- 3 µl UTP solution (50mM)
- 4 µl T7 10X reaction buffer

- 4 µl T7 enzyme mix

Mélanger en vortexant gentiment et centrifuger brièvement (5 sec) et mettre sur glace

- Ajouter 26 µl de IVT master mix à chaque échantillon
- Mélanger par pipetage 2 à 3 fois, puis centrifuger brièvement 5 sec
- Incuber à 37°C pendant 16 h
- Arrêter la réaction avec 60 µl d'H2O nuclease free pour obtenir un volume de 100 µl
- Vortexer gentiment et procéder immédiatement à la purification.

Purification de l'ARNa marqué

Préchauffer H_2O nuclease free pendant au moins 10 min à 55°C

- Ajouter 105 µl ARNa binding buffer à chaque échantillon
- Ajouter 75 µl d'éthanol 100% et mélanger par pipetage 2 à 3 fois
- Transférer le mélange sur une colonne ARNa marqué
- Centrifuger 1 min à 10000g, puis éliminer le surnageant
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage
- Centrifuger 1 min à 10000g
- Eliminer le surnageant et centrifuger de nouveau 1 min pour enlever les traces
- Transférer la colonne sur un tube d'élution
- Ajouter 10 µl d'H_2O préchauffée à 55°C
- Eluer 2 min à température ambiante
- Centrifuger 1.5 min à 10000g
- Répéter ces 2 dernières étapes
- L'ARNa marqué est ainsi élué dans environ 20 µl
- Estimer la concentration en Cyanines au Nanodrop (2 µl nécessaires)
- Conserver les échantillons marqués à -20°C à l'obscurité

Annexe 5 : Récapitulatif des gènes dont l'expression est affectée par la gravité. Le niveau d'expression du gène est significativement plus élevé dans le peuplier incliné par rapport au témoin si Logratio moyen est positif et inversement qu'il est significativement réduit si Logratio moyen est négatif.

Nombre de gène	Catégorie	Accession	Fonction	Ratio (Incliné/témoin)	Logratio Moyen
	Energie				
1		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.546	-1.146
2		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.597	-1.343
3		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.643	-1.570
4		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.648	-1.595
5		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.664	-1.696
6		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.666	-1.706
7		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.683	-1.816
8		estExt_fgenesh4_pg.C_1700003	H+-transporting two-sector ATPase	0.698	-1.925
9		gw1.20770.4.1	F0F1-type ATP synthase	0.710	-2.025
	Ligninfication				
10		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.555	-1.177
11		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.556	-1.182
12		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.642	-1.565
13		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.649	-1.605
14		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.671	-1.740
15		gw1.123.86.1	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.685	-1.829
16		estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX2359	CAD - cinnamyl alcohol dehydrogenase	1.454	1.851
17		fgenesh4_pg.C_LG_XIX000854	putative orcinol O-methyltransferase	0.497	-0.990
18		fgenesh4_pg.C_LG_XIX000854	putative orcinol O-methyltransferase	0.530	-1.092
19		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.642	-1.566
20		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.649	-1.606
21		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.651	-1.614
22		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.651	-1.618
23		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.658	-1.657
24		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.659	-1.662
25		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.671	-1.736
26		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.682	-1.811
27		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.688	-1.850
28		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0129	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 (COMT-1)	0.692	-1.883
29		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I1023	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2 (CCoAMT-2)	1.401	2.054
30		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I1023	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2 (CCoAMT-2)	1.406	2.036
31		grail3.0021004701	Glutathione-dependent formaldehyde-activating, GFA	1.590	1.495
32		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.601	-1.360
33		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.623	-1.466
34		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.662	-1.678
35		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.681	-1.803
36		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.683	-1.817
37		estExt_Genewise1_v1.C_280658	PAL - Phenylalanine and histidine ammonia-lyase	0.695	-1.901
38		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.652	-1.619
39		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.654	-1.634
40		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.673	-1.751
41		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.674	-1.759
42		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.695	-1.908
43		estExt_Genewise1_v1.C_LG_XII1463	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.698	-1.929
	Métabolisme des carbohydrates				
44		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0989	Phosphoglucomutase	0.581	-1.275
45		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0989	Phosphoglucomutase	0.613	-1.417
46		grail3.0039009101	Glycoside hydrolase, family 28	0.615	-1.426
47		grail3.0039009101	Glycoside hydrolase, family 28	0.629	-1.494
48		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.617	-1.435
49		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.621	-1.455
50		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.637	-1.536
51		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.638	-1.544
52		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.642	-1.562
53		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.646	-1.585
54		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.649	-1.605
55		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.656	-1.647
56		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.677	-1.778
57		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1860	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.689	-1.858
58		eugene3.00700070	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	0.705	-1.982
59		eugene3.00180906	UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase	0.676	-1.773
60		eugene3.00180906	UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase	0.685	-1.833
61		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2408	UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase	0.701	-1.955
62		estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2408	UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase	0.711	-2.031
63		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I0969	Glycine hydroxymethyltransferase	0.698	-1.926
64		estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I0969	Glycine hydroxymethyltransferase	0.705	-1.982

Transport				
65	estExt_fgenesh4_pm.C_280080	Mn2+ and Fe2+ transporters of the NRAMP family	0.585	-1.293
66	estExt_fgenesh4_pm.C_280080	Mn2+ and Fe2+ transporters of the NRAMP family	0.603	-1.369
67	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XV1399	Xanthine/uracil transporters	0.644	-1.575
68	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.626	-1.479
69	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.629	-1.494
70	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.629	-1.497
71	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.637	-1.534
72	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.642	-1.563
73	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.644	-1.574
74	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.644	-1.574
75	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.647	-1.590
76	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.675	-1.764
77	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.688	-1.853
78	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.692	-1.883
79	estExt_Genewise1_v1.C_LG_I5715	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.695	-1.907
80	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.704	-1.971
81	eugene3.00102165	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.704	-1.973
82	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III0271	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.710	-2.023
83	grail3.0049017002	Aquaporin (major intrinsic protein family)	0.711	-2.036
84	grail3.0038018602	Endosomal membrane proteins, EMP70	1.410	2.017
85	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.442	1.895
86	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.459	1.835
87	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.464	1.817
88	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.518	1.662
89	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.537	1.614
90	eugene3.00090923	Ran-binding protein RANBP1 and related RanBD domain proteins	1.551	1.579
91	grail3.0034007101	Phosphatidylinositol transfer protein SEC14 and related proteins	1.601	1.473
92	eugene3.00031404	Nuclear transport factor 2	1.438	1.910
93	eugene3.00031404	Nuclear transport factor 2	1.442	1.893
Expression des gènes et des protéines				
94	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.600	-1.359
95	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.614	-1.421
96	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.660	-1.671
97	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.665	-1.701
98	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.667	-1.709
99	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.670	-1.730
100	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.679	-1.789
101	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.689	-1.863
102	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.704	-1.975
103	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.706	-1.988
104	eugene3.00111103	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.708	-2.011
105	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VII0088	Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1)	0.713	-2.050
106	estExt_fgenesh4_kg.C_870004	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon	0.671	-1.736
107	estExt_fgenesh4_kg.C_870004	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon	0.700	-1.941
108	estExt_fgenesh4_kg.C_870004	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon	0.707	-2.003
109	estExt_fgenesh4_kg.C_870004	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon	0.713	-2.045
110	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.404	2.042
111	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.411	2.011
112	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.415	1.996
113	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.416	1.995
114	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.436	1.917
115	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.481	1.765
116	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.564	1.550
117	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.571	1.534
118	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.580	1.515
119	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.605	1.464
120	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVIII0351	Eukaryotic initiation factor 5A hypusine (eIF-5A)	1.627	1.424
121	gw1.70.171.1	AUX-IAA TF family (DPTF annotation) AUX/IAA protein	1.447	1.877
122	eugene3.00021666	60S acidic ribosomal protein P1	1.421	1.975
123	eugene3.00070822	Elongation factor G, domain IV	1.672	1.349
124	gw1.XVIII.1819.1	PHD TF family (DPTF annotation)	1.566	1.546
125	gw1.XVIII.34.1	Ca2+-dependent lipid-binding protein	0.697	-1.922
126	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.642	-1.564
127	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.645	-1.579
128	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VIII0594	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.645	-1.582
129	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.673	-1.752

130	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.686	-1.838
131	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VIII0594	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.686	-1.838
132	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.701	-1.955
133	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X3317	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	0.712	-2.042
134	eugene3.00080489	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	0.617	-1.433
135	eugene3.00080489	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	0.659	-1.660
136	eugene3.00080489	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	0.693	-1.887
137	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.480	1.768
138	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.547	1.589
139	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.548	1.586
140	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.581	1.512
141	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.608	1.459
142	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.624	1.429
143	grail3.0095002101	Zn-finger, C2H2 type containing protein - IPR007087	1.646	1.390
144	estExt_Genewise1_v1.C_1520011	Predicted Zn-finger protein	1.535	1.618
145	estExt_Genewise1_v1.C_1520011	Predicted Zn-finger protein	1.544	1.597
146	grail3.0001021601	Predicted Zn-finger protein	1.656	1.374
147	grail3.0001021601	Predicted Zn-finger protein	1.666	1.357
148	eugene3.00280292	Serine/threonine protein kinase	0.688	-1.850
149	eugene3.00280292	Serine/threonine protein kinase	0.696	-1.909
150	grail3.0152000301	Serine/threonine protein kinase	0.709	-2.015
151	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VIII0972	Serine/threonine protein kinase	0.701	-1.949
152	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VIII0972	Serine/threonine protein kinase	0.699	-1.933
153	fgenesh4_pm.C_LG_XIX000099	Casein kinase (serine/threonine/tyrosine protein kinase)	1.411	2.015
154	gw1.XIV.2852.1	Predicted E3 ubiquitin ligase	0.704	-1.975
155	estExt_Genewise1_v1.C_1240101	Predicted E3 ubiquitin ligase	1.599	1.477
156	estExt_Genewise1_v1.C_1240101	Predicted E3 ubiquitin ligase	1.660	1.368
157	eugene3.00141439	26S proteasome subunit P45	1.534	1.620
158	eugene3.00141439	26S proteasome subunit P45	1.635	1.410
159	eugene3.00141439	26S proteasome subunit P45	1.534	1.620
160	eugene3.00141439	26S proteasome subunit P45	1.635	1.410
161	gw1.VIII.591.1	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB5/PSMB8/PRE2	1.547	1.588
162	gw1.VIII.591.1	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB5/PSMB8/PRE2	1.627	1.424
163	gw1.XI.101.1	Ubiquitin-specific protease UBP14	0.681	-1.802
164	gw1.XI.101.1	Ubiquitin-specific protease UBP14	0.692	-1.884
165	gw1.VIII.591.1	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB5/PSMB8/PRE2	1.547	1.588
166	gw1.VIII.591.1	20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB5/PSMB8/PRE2	1.627	1.424
167	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI1248	60S ribosomal protein L11	1.429	1.941
168	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI1248	60S ribosomal protein L11	1.456	1.845
169	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0715	60S RIBOSOMAL PROTEIN L44	1.413	2.004
170	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.485	1.752
171	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.486	1.749
172	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.502	1.705
173	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.511	1.680
174	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.530	1.630
175	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.552	1.578
176	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0552	60S ribosomal protein L26	1.573	1.530
177	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV2725	60S ribosomal protein L36	1.785	1.196
178	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV2725	60S ribosomal protein L36	1.876	1.102
179	eugene3.00190574	ribosomal protein S26	0.609	-1.398
180	eugene3.00190574	ribosomal protein S26	0.621	-1.454
181	eugene3.00190574	ribosomal protein S26	0.684	-1.825
182	eugene3.00190574	ribosomal protein S26	0.709	-2.014
183	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VI2460	60S ribosomal protein L37	0.682	-1.812
184	estExt_Genewise1_v1.C_LG_VI2460	60S ribosomal protein L37	0.685	-1.834
185	fgenesh4_pg.C_LG_VII000976	Guanine nucleotide binding protein (G-protein), alpha subunit	0.617	-1.434
186	fgenesh4_pg.C_LG_VII000976	Guanine nucleotide binding protein (G-protein), alpha subunit	0.628	-1.490
187	eugene3.00290196	Predicted GTPase-activating protein	0.708	-2.009
188	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_IX1338	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)	1.417	1.989
189	estExt_Genewise1_v1.C_LG_II3432	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)	1.453	1.856
190	eugene3.00070174	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)	1.625	1.428
191	eugene3.00070174	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)	1.627	1.424
192	grail3.0345000101	Disease resistance protein, contains NB-ARC domain	0.539	-1.121
193	grail3.0345000101	Disease resistance protein, contains NB-ARC domain	0.561	-1.201
194	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III1771	MAPK related serine/threonine protein kinase	0.667	-1.712
195	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III1771	MAPK related serine/threonine protein kinase	0.686	-1.842
196	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III1771	MAPK related serine/threonine protein kinase	0.688	-1.855
	Transport d'électron			
197	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XIV0527	KAO2 (ent-kaurenoic acid oxidase)	0.622	-1.459
198	eugene3.03470003	Predicted membrane protein	0.659	-1.663
199	eugene3.03470003	Predicted membrane protein	0.698	-1.931
200	fgenesh4_pg.C_LG_XIX000103	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily	0.700	-1.944
201	fgenesh4_pg.C_LG_XIX000103	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily	0.700	-1.946
202	grail3.0061012401	Cytochrome c oxidase subunit Vc	1.410	2.018
203	grail3.0061012401	Cytochrome c oxidase subunit Vc	1.458	1.839
204	grail3.0061012401	Cytochrome c oxidase subunit Vc	1.564	1.550
205	grail3.0061012401	Cytochrome c oxidase subunit Vc	1.582	1.510
206	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II0928	Blue (type 1) copper domain - plastocyanin-like	1.503	1.701
207	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II0928	Blue (type 1) copper domain - plastocyanin-like	1.515	1.670
208	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II0928	Blue (type 1) copper domain - plastocyanin-like	1.531	1.628
209	gw1.XVII.1273.1	Plastocyanin-like	1.611	1.453

Métabolisme des acides aminés				
210	eugene3.00021350	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	0.624	-1.471
211	eugene3.00021350	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	0.649	-1.606
212	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.570	-1.232
213	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.575	-1.254
214	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.652	-1.623
215	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.664	-1.695
216	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.699	-1.937
217	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.700	-1.942
218	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.701	-1.949
219	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIX1125	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	0.706	-1.991
220	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_IX0162	Vitamin-B12-independent methionine synthase	0.709	-2.017
221	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.403	2.046
222	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.442	1.893
223	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.451	1.862
224	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.474	1.785
225	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.520	1.655
226	eugene3.00101190	U4/U6-associated splicing factor PRP4	1.525	1.643
227	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0999	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1.632	1.415
228	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X0999	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1.646	1.391
229	gw1.XVIII.3218.1	Predicted aminopeptidase of the M17 family	0.629	-1.497
230	gw1.XVIII.3218.1	Predicted aminopeptidase of the M17 family	0.638	-1.542
231	gw1.XVIII.3218.1	Predicted aminopeptidase of the M17 family	0.676	-1.772
232	grail3.0013022501	Asparaginyl peptidases	0.589	-1.309
233	grail3.0013022501	Asparaginyl peptidases	0.604	-1.375
Cytosquelette				
234	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.630	-1.501
235	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.663	-1.687
236	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.673	-1.748
237	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.684	-1.822
238	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.684	-1.825
239	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.690	-1.871
240	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.700	-1.946
241	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.701	-1.955
242	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.705	-1.981
243	gw1.IX.2621.1	Alpha tubulin	0.714	-2.054
244	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1020	Alpha tubulin	1.894	1.085
245	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1020	Alpha tubulin	1.940	1.046
246	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0458	Beta tubulin	0.657	-1.652
247	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0458	Beta tubulin	0.675	-1.765
248	grail3.0068008502	Beta tubulin	0.682	-1.812
249	grail3.0068008502	Beta tubulin	0.689	-1.862
250	grail3.0013025102	Profilin	1.400	2.058
251	grail3.0013025102	Profilin	1.421	1.971
252	grail3.0007002601	Profilin	1.425	1.957
253	grail3.0013025102	Profilin	1.428	1.945
254	grail3.0013025102	Profilin	1.431	1.933
255	grail3.0007002601	Profilin	1.442	1.894
256	grail3.0013025102	Profilin	1.464	1.819
257	grail3.0013025102	Profilin	1.464	1.818
258	grail3.0013025102	Profilin	1.489	1.740
259	grail3.0013025102	Profilin	1.493	1.730
260	grail3.0013025102	Profilin	1.504	1.697
261	grail3.0013025102	Profilin	1.511	1.679
262	grail3.0013025102	Profilin	1.576	1.524
263	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4297	Actin depolymerizing factor	1.572	1.533
Métabolisme des nucléotides				
264	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I3337	Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin	0.633	-1.515
265	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I3337	Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin	0.654	-1.631
Réponse au stress				
266	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V0157	Annexin	0.691	-1.874
267	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V0157	Annexin	0.697	-1.923
268	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V0157	Annexin	0.709	-2.017
269	eugene3.01230072	14-3-3 protein	0.707	-1.996
270	eugene3.01230072	14-3-3 protein	0.708	-2.006
271	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.403	2.049
272	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.447	1.877
273	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.448	1.872
274	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.472	1.792
275	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.477	1.776
276	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.481	1.766
277	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.532	1.626
278	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.553	1.574
279	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.572	1.533
280	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.581	1.514
281	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.655	1.376
282	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V1612	Dehydrin Dhn1	1.669	1.353

	Métabolismes des lipides			
283	estExt_fgenesh4_pg.C_1660009	Aspartyl protease	0.710	-2.023
	Métabolisme de l'azote			
284	estExt_fgenesh4_pg.C_1220090	Glutamine synthetase	0.711	-2.032
285	estExt_fgenesh4_pg.C_1220090	Glutamine synthetase	0.711	-2.033
	Paroi cellulaire			
286	grail3.0094006801	PopFLA5 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.415	1.997
287	grail3.0094006801	PopFLA5 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.453	1.854
288	grail3.0094006801	PopFLA5 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.539	1.607
289	grail3.0094006801	PopFLA5 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.610	1.455
290	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.419	1.980
291	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.431	1.933
292	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.449	1.870
293	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.459	1.835
294	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.493	1.728
295	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.494	1.727
296	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.495	1.724
297	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.497	1.719
298	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.529	1.634
299	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.531	1.627
300	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.535	1.618
301	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.539	1.608
302	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.544	1.597
303	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.563	1.553
304	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX4802	PopFLA8 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.568	1.540
305	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.413	2.003
306	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.422	1.967
307	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.435	1.920
308	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.440	1.901
309	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.447	1.876
310	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.449	1.869
311	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.473	1.791
312	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.518	1.660
313	eugene3.00151077	PopFLA15 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.519	1.658
314	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.430	1.937
315	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.470	1.799
316	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.516	1.666
317	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.519	1.657
318	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.520	1.656
319	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.538	1.611
320	eugene3.00131208	PopFLA6 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.558	1.562
321	grail3.0031016901	PopFLA7 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.454	1.853
322	grail3.0031016901	PopFLA7 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.489	1.741
323	grail3.0031016901	PopFLA7 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.527	1.637
324	grail3.0031016901	PopFLA7 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.552	1.577
325	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.470	1.799
326	eugene3.00131210	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.499	1.713
327	eugene3.00131210	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.545	1.593
328	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.578	1.520
329	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.604	1.466
330	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.638	1.405
331	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.733	1.260
332	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.753	1.235
333	eugene3.00130132	PopFLA4 (Beta-Ig-H3/fasciclin)	1.759	1.228
334	estExt_fgenesh4_pg.C_1480042	Glycosyl transferase, family 48	0.476	-0.933
335	estExt_fgenesh4_pg.C_1480042	Glycosyl transferase, family 48	0.486	-0.960
336	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I0109	Glycosyl transferase, family 48	0.523	-1.068
337	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I0109	Glycosyl transferase, family 48	0.526	-1.079
338	gw1.V.3193.1	Cellulose synthase	0.538	-1.118
339	gw1.V.3193.1	Cellulose synthase	0.588	-1.305
340	gw1.XVIII.3152.1	Cellulose synthase	0.646	-1.584
341	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0650	Cellulose synthase	0.664	-1.690
342	gw1.XVIII.3152.1	Cellulose synthase	0.665	-1.702
343	gw1.XVIII.3152.1	Cellulose synthase	0.689	-1.861
	Croissance			
344	eugene3.00121021	Exostosin-like	1.558	1.564
345	eugene3.00121021	Exostosin-like	1.590	1.495
	Cycle celluliare			
346	estExt_fgenesh4_pm.C_1630014	Cyclin-dependent kinase, regulatory subunit	1.764	1.221
347	estExt_fgenesh4_pm.C_1630014	Cyclin-dependent kinase, regulatory subunit	1.839	1.138

	Inconnus			
348	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.526	-1.077
349	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.527	-1.084
350	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.543	-1.134
351		Unknown (small protein) no SP	0.544	-1.139
352	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.553	-1.171
353	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.570	-1.235
354	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.599	-1.351
355	gw1.123.91.1	Unknown (small protein) no SP	0.600	-1.355
356	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.667	-1.711
357	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.685	-1.831
358	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.697	-1.921
359	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.708	-2.008
360	grail3.0140003901	Unknown	1.535	1.617
361	grail3.0035028601	unknown	1.526	1.641
362	grail3.0035028601	unknown	1.525	1.643
363	grail3.0140003901	Unknown	1.515	1.668
364	grail3.0140003901	Unknown	1.463	1.823
365	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0987	Unknown	1.448	1.871
366	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0987	Unknown	1.442	1.894
367	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0987	Unknown	1.423	1.966
368	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV0987	Unknown	1.412	2.010
369	grail3.0035028601	unknown	1.402	2.053
370	grail3.0040028802	Unknown	0.692	-1.883
371	grail3.0040028802	Unknown	0.689	-1.861
372	grail3.0040028802	Unknown	0.669	-1.722
373	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_III0726	Uncharacterized high-glucose-regulated protein	0.667	-1.711
374	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_III0726	Uncharacterized high-glucose-regulated protein	0.688	-1.855
375	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.667	-1.711
376	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.685	-1.831
377	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.697	-1.921
378	eugene3.00080178	Protein of unknown function DUF231	0.708	-2.008
379	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0311	Protein of unknown function DUF1218 IPR009606	1.402	2.053
380	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0311	Protein of unknown function DUF1218 IPR009606	1.404	2.043
381	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0311	Protein of unknown function DUF1218 IPR009606	1.418	1.985
382	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0311	Protein of unknown function DUF1218 IPR009606	1.426	1.954
383	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0311	Protein of unknown function DUF1218 IPR009606	1.480	1.767
384	eugene3.00700157	Uncharacterized conserved protein, contains IPR000533 Tropomyosin	1.448	1.873
385	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.487	1.747
386	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.534	1.621
387	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.590	1.494
388	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.597	1.480
389	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.601	1.473
390	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.615	1.445
391	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.695	1.313
392	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.703	1.302
393	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.720	1.278
394	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.730	1.264
395	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.749	1.239
396	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.767	1.218
397	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.769	1.215
398	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.783	1.199
399	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.786	1.196
400	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.792	1.188
401	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.797	1.183
402	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.798	1.181
403	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.803	1.175
404	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.812	1.166
405	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.814	1.164
406	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.834	1.143
407	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.847	1.130
408	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.849	1.128
409	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.850	1.127
410	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.854	1.122
411	No hits found	Unknown - Small protein with SP + potential GPI anchor + PAST rich backbone	1.915	1.067
412	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI1052	Uncharacterized conserved protein, contains ML domain	1.497	1.718
413	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI1052	Uncharacterized conserved protein, contains ML domain	1.529	1.633
	Hépoyhétiques			
414	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2562	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)	0.576	-1.257
415	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2562	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)	0.603	-1.370
416	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2562	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)	0.663	-1.688
417	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2562	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)	0.693	-1.890
418	grail3.0062001301	Predicted hydrolase (HIT family)	0.584	-1.288
419	grail3.0062001301	Predicted hydrolase (HIT family)	0.586	-1.299
420	grail3.0062001301	Predicted hydrolase (HIT family)	0.594	-1.330
421	grail3.0062001301	Predicted hydrolase (HIT family)	0.603	-1.371
422	gw1.XIII.1801.1	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	0.586	-1.297
423	gw1.XIII.1801.1	O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT	0.616	-1.429

424	estExt_Genewise1_v1.C_640646	Similar to sp|P83304|LEC_PARPC Mannose/glucose-specific lectin	0.599	-1.353
425	gw1.XI.1745.1	PH domain-containing protein	0.601	-1.362
426	gw1.40.135.1	Speckle-type POZ protein SPOP and related proteins with TRAF	0.615	-1.425
427	gw1.40.135.1	Speckle-type POZ protein SPOP and related proteins with TRAF	0.654	-1.633
428	eugene3.00131099	FOG: Ankyrin repeat	0.616	-1.433
429	eugene3.00131099	FOG: Ankyrin repeat	0.628	-1.487
430	gw1.XVI.771.1	Plant lipid transfer protein/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor IPR003612	0.622	-1.459
431	gw1.XVI.771.1	Plant lipid transfer protein/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor IPR003612	0.644	-1.575
432	gw1.XVI.771.1	Plant lipid transfer protein/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor IPR003612	0.670	-1.729
433	gw1.XVI.771.1	Plant lipid transfer protein/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor IPR003612	0.679	-1.793
434	eugene3.00120551	DEAD/DEAH box helicase	0.636	-1.531
435	eugene3.00120551	DEAD/DEAH box helicase	0.641	-1.561
436	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV1157	ATP-dependent RNA helicase	0.640	-1.552
437	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV1157	ATP-dependent RNA helicase	0.646	-1.584
438	gw1.X.4168.1	BTB/POZ	0.643	-1.570
439	gw1.X.4168.1	BTB/POZ	0.697	-1.923
440	grail3.0147001601	Vesicle coat complex COPI, beta subunit	0.665	-1.697
441	estExt_Genewise1_v1.C_820082	Acyl-CoA synthetase	0.669	-1.725
442	eugene3.00140347	Nucleolar GTPase/ATPase p130	0.674	-1.758
443	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV0740	Transketolase	0.678	-1.781
444	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV0740	Transketolase	0.695	-1.905
445	eugene3.00141104	Projectin/twitchin and related proteins	0.694	-1.895
446	eugene3.00141104	Projectin/twitchin and related proteins	0.698	-1.930
447	gw1.210.58.1	Kinesin-like protein	0.706	-1.990
448	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI0110	Scaffold/matrix specific factor hnRNP-U/SAF-A, contains SPRY domain	1.405	2.040
449	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI0110	Scaffold/matrix specific factor hnRNP-U/SAF-A, contains SPRY domain	1.459	1.835
450	estExt_Genewise1_v1.C_640357	Ribokinase	1.412	2.011
451	estExt_Genewise1_v1.C_640357	Ribokinase	1.413	2.003
452	estExt_Genewise1_v1.C_400962	F-box protein FBX9	1.434	1.924
453	estExt_Genewise1_v1.C_400962	F-box protein FBX9	1.457	1.843
454	estExt_Genewise1_v1.C_LG_I1393	C2H2 TF family (DPTF annotation)	1.457	1.842
455	estExt_Genewise1_v1.C_LG_I1393	C2H2 TF family (DPTF annotation)	1.490	1.739
456	grail3.0003028702	Golgi proteins involved in ER retention (RER)	1.472	1.793
457	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1071	LIM TF family (DPTF annotation) Regulatory protein MLP and related LIM proteins	1.557	1.566
458	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1071	LIM TF family (DPTF annotation) Regulatory protein MLP and related LIM proteins	1.621	1.435
459	grail3.0018035501	Reticulon	1.571	1.534
460	grail3.0018035501	Reticulon	1.624	1.429
461	fgenesh4_pg.C_LG_XV000741	Protein involved in membrane traffic (YOP1/TB2/DP1/HVA22 family)	1.573	1.531
462	fgenesh4_pg.C_LG_XV000741	Protein involved in membrane traffic (YOP1/TB2/DP1/HVA22 family)	1.695	1.314
463	estExt_fgenesh4_pm.C_290135	Cell cycle-associated protein Mob1-1	1.597	1.480
464	estExt_fgenesh4_pm.C_290135	Cell cycle-associated protein Mob1-1	1.669	1.353
465	grail3.0001126601	FOG: Leucine rich repeat	1.599	1.476
466	estExt_Genewise1_v1.C_LG_II3659	Protein tyrosine phosphatase SHP1/Cofactor for p97 ATPase-mediated	1.601	1.473
467	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX0048	Inner membrane protein required for assembly of the F0 sector of ATP synthase	1.613	1.450
468	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IX0048	Inner membrane protein required for assembly of the F0 sector of ATP synthase	1.637	1.407
469	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1071	LIM TF family (DPTF annotation) Regulatory protein MLP and related LIM proteins	1.557	1.566
470	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_II1071	LIM TF family (DPTF annotation) Regulatory protein MLP and related LIM proteins	1.621	1.435
471	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_VI0500	C-type lectin	1.637	1.406
472	estExt_fgenesh4_kg.C_LG_VIII0078	N-methyl-D-aspartate receptor glutamate-binding subunit	1.666	1.359
473	estExt_fgenesh4_kg.C_LG_VIII0078	N-methyl-D-aspartate receptor glutamate-binding subunit	1.681	1.335
474	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XIX0984	Similar to Kunitz trypsin inhibitor 3. [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	0.709	-2.014

Annexe 6

Gamme étalon réalisée avec Albumine Sérique Bovine (BSA)

Quantité de protéines (µg)	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**
BSA (µl)	0	5	10	15	20
Tampon T.C.T (µl)	20	15	10	5	0
HCl 0.1 N (µl)	10	10	10	10	10
H_2O (µl)	70	70	70	70	70
Dye reagent dilué 3X (ml) (Bio-Rad)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

Préparation des échantillons

Volume échantillon à prélever (µl)	5
Tampon T.C.T (µl)	15
HCl 0.1 N (µl)	10
H_2O (µl)	70
Dy ereagent dilué 3X (ml) (Bio-Rad)	3.5

Annexe 7

Solution de résolubilisation (U.K.S)

Urée 9.5 M		22.8 g
K_2CO_3 (2.8% solution stock) 5 mM		1 ml
SDS (10% solution stock) 1.25%		5 ml
DTT 0.5%		200 mg
Triton X-100 (20% solution stock) 6%		12 ml
Ampholytes pH 4-7 2%		2 ml
H_2O MilliQ	qsp	40 ml

Solution de résolubilisation (T.C.T)

Urée 7 M		21 g
Triton X-100 (20% solution stock) 0.4%		1 ml
Chaps 4%		2 g
Thiourée 2%		7.61 g
DTT 10 mM		77.12 mg
Ampholytes pH 4-7 1%		0.5 ml
H_2O MilliQ	qsp	50 ml

Annexe 8

Gel de séparation 12% (calcul pour 10 ml)

H_2O distillée	4.5 ml
Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml
SDS (10% solution stock)	100 µl
Acrylamide/Bis (40%)	3 ml
Ammonium persulfate (10%)	50 µl (à faire extemporanément)
TEMED	5 µl

Gel de concentration 4% (calcul pour 10 ml)

H_2O distillée	6.4 ml
Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	2.5 ml
SDS (10% solution stock)	100 µl
Acrylamide/Bis (40%)	1 ml
Ammonium persulfate (10%)	50 µl (à faire extemporanément)
TEMED	10 µl

Tampon de migration 5X

Tris base		9 g
Glycine		43.2 g
SDS		3 g
H_2O distillée	qsp	600 ml

Annexe 9

Amorces utilisées pour la RT- PCR quantitative

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	Longueur (bp)	Temp. d'hybridation (°C)
POCCH	ATGTCTCAGACTGTTGTCCTC	GGCGGTCTTCTTCCCGGTCTT	195	56
OEE1	GGTGTGCCTTCTAGGACCAG	TCGGAACTCCTTCAGCACTT	179	61
OEE2	GCAGGCAGTACAGGAAGAGG	TCAGAACCTGACCAGGGAAC	248	61
Cu/Zn SOD	TGGCACCATCTTCTTTACCC	TGACATTTCCCAGATCACCA	215	59
ATPase	CACTCAATCCGGTTGGTTCT	TGGAGCCTCCCTATGAATTG	243	59
SAMs	GGCACTGGAAAAATTCCTGA	CTTGACCACTTCCCCAGGTA	179	61
APX2	GGACGATCAGACACCCAGAT	CCTTCTGGAGGTGGATCAGA	214	58
Thx h	AGGGAAAGGGGTCTCAGAAA	ATTGCCTCCACATTCCACTC	178	55
18S rRNA	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA	232	55 to 61

Annexe 10

Méthode de calcul ΔΔCt

La quantité de gène cible, normalisée avec un gène référence et relative à un calibreur est donnée par la formule suivante :

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

L'équation est décrit la réaction exponentielle de PCR est :

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Où :

X_n : Nombre de molécules de cibles au cycle n

X_0 : Nombre initial de molécules cibles

E_x : Efficacité de l'amplification de la cible

n : Nombre de cycles

Le cycle seuil (Ct) indique le nombre de cycles pour lequel la quantité de cible amplifiée atteint un seuil fixé. Alors,

$$X_t = X_0 \times (1 + E_x)^{Ct,x}$$

Où :

Xt : Nombre de molécules de cibles au seuil

$C_{t,x}$: Cycle seuil pour l'amplification de la cible

Une équation similaire pour le gène référence est obtenue :

$$R_t = R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,r}$$

Où :

Rt : Nombre de molécules de référence au seuil

R_0 : Nombre initial de molécules de références

E_R : Efficacité de l'amplification de la référence

$C_{t,r}$: Cycle seuil pour l'amplification de la référence

La division de X_t par R_t donne l'expression suivante :

$$\frac{Xt}{Rt} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{Ct,x}}{R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,r}} = K$$

En s'assurant que les efficacités de la cible et de la référence soient relativement les mêmes (calcul de l'efficacité grâce à une courbe standard) : $E_x = E_R = E$,

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + Ex)^{Ct,x - Ct,r} = K$$

Ou

$$X_N \times (1 + Ex)^{\Delta Ct} = K$$

Où :

X_N : X_0/R_0, quantité normalisée de cible

ΔCt : Ct,x – Ct,r, différence de cycles au seuil pour le gène cible et le gène référence

En réarrangeant on obtient la formule suivante :

$$X_N = K \times (1 + E_x)^{-\Delta Ct}$$

L'étape finale est de diviser le X_N de chaque échantillon (q) par X_N du calibreur (cb) :

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E_x)^{-\Delta Ct,q}}{K \times (1 + E_x)^{-\Delta Ct,cb}} = (1 + E_x)^{-\Delta\Delta Ct}$$

Où :

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct,q - \Delta Ct,cb$

L'efficacité d'amplification dans les conditions optimales pour la PCR quantitative (taille < 150 bp) est proche de 1. La quantité de gène cible, normalisée avec le gène de référence et relative au calibreur, est alors donnée par la formule suivante :

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Annexe 11

Tampon TBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Tris base	3 g
H_2O	800 ml

Ajuster le pH à 8 avec de HCl 1 M

Ajuster le volume à 1 litre

Autoclaver et conserver à température ambiante

Tampon PBS 10 X :

NaCl	80 g	40 g
KCl	2 g	1 g
Na_2HPO_4	14,4 g	7,2 g
KH_2PO_4	2,4 g	1,2 g
H_2O qsp	1 l	500 ml

Ajuster le pH à 7 avec NaOH et autoclaver

FAA : à préparer extemporanément :

Formaldéhyde 3,7 % (v/v)

Ethanol 50 % (v/v)

Acide acétique 5% (v/v)

RESUME

Le redressement du peuplier suite à une stimulation gravitationnelle implique un processus de courbure locale lié à une élongation différentielle dans les zones en croissance primaire et un processus de courbure lié à la différentiation du bois de réaction dans les zones en croissance secondaire. Ces modifications morphogénétiques sont détectées au niveau de la région basale et apicale de la tige de peuplier inclinée. La région basale a développé le bois de tension une semaine après l'inclinaison, alors que la région apicale est réorientée 24h après l'inclinaison. Ceci implique que les tissus de la région basale et apicale de la tige répondent de façon différente à l'inclinaison.
Une étude d'expression menée au niveau du transcriptome a été réalisée à partir des ARNm extraits de tiges ayant été ou non inclinés pendant 45 min. En 45 min, la plante ne s'est pas redressée, mais a perçu le signal. Cette approche a permis d'identifier des transcrits de gènes impliqués dans la graviperception. L'étude de la régulation du transcriptome a été élargie par une analyse de la variation de l'accumulation des protéines extraites de tiges inclinées ou non. Les profils d'électrophorèse bidimensionnelle des conditions non stressées et stressées de la région basale et apicale ont montré une variation dans l'accumulation des protéines. Une analyse par RT-PCR quantitative de certaines protéines différentielles dont l'activité est potentiellement régulée par la thioredoxine (Trx) montre une accumulation de transcrits variable entre la région apicale et basale et des changements d'expression rapides et transitoires. Une étude complémentaire sur 2 thioredoxines (Trx) (western blot, immunolocalisation *in situ*) a permis de montrer d'une part l'expression de Trx h1 une semaine après l'inclinaison et d'autre part la localisation de Trx h1 et Trx h2 au niveau des amyloplastes.
L'ensemble de ces résultats a conduit à suggérer que les évènements moléculaires conduisant à la réorientation de la tige sont différents selon le tissu analysé. Probablement, chaque partie de la tige reçoit et répond différemment au signal gravité.

Mots-clés: Peuplier, Stimulation gravitationnelle, Transcriptome, Electrophorèse bidimensionnelle, Thioredoxine

---

ABSTRACT

The upright reorientation of poplar after gravistimulation involves a differential growth in zones of primary elongation, and a differentiation of reaction wood in zones of secondary growth. These modifications are detected in the basal and apical regions of inclined poplar stem. The basal region developed tension wood one week after inclination, while the apical region was reoriented 24 hours after inclination. This implies that the tissues of the basal and apical region of the stems respond differently to inclination.
An expression study carried out at the transcriptomic level was developed using mRNA extracted from control and inclined stems during 45 min. After 45 min inclination, the straightening had not started. We identified genes involved in the graviperception and genes regulated during tension wood formation. The transcriptomic approach was broadened to the analysis of protein accumulation extracted from control and inclined stems. Two-dimensional gel electrophoresis patterns of the same control and stress conditions of the basal and apical region showed different protein accumulation. An analysis by quantitative RT-PCR of selected proteins, potentially regulated by the thioredoxin (Trx), showed different transcript accumulation between basal and apical region with fast and transient changes of expression. A study carried out on 2 thioredoxins (Trx) (western blot, immunolocalisation *in situ*) showed the expression of Trx h1 a week after inclination and the localization of Trx h1 and Trx h2 in the amyloplasts.
These results led to suggest that molecular events leading to stem reorientation are different according to the analyzed tissue. It is probable that each region of the stem receives and responds differently to gravity signal.

Key-words: Poplar, Gravistimulation, Transcriptomic, Two-dimensional gel electrophoresis, Thioredoxin