HAL
open science

Etude de la variabilité génétique des réponses écophysiologique et moléculaire associées au transport d'eau dans la feuille de peuplier noir en carence hydrique

Marie Garavillon-Tournayre

To cite this version:

Marie Garavillon-Tournayre. Etude de la variabilité génétique des réponses écophysiologique et moléculaire associées au transport d'eau dans la feuille de peuplier noir en carence hydrique. Milieux et Changements globaux. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC045 . tel-01731585

HAL Id: tel-01731585

https://theses.hal.science/tel-01731585

Submitted on 14 Mar 2018

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 CLERMONT AUVERGNE *CLERMONT UNIVERSITE*

N° D.U. : 2814 ANNEE 2017

Ecole Doctorale Sciences de la vie, Santé, Agronomie, Environnement
N° d'ordre : 718

Thèse
Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Physiologie et Biologie Moléculaire Végétales)

Soutenue le 13 Juin 2017

Marie GARAVILLON-TOURNAYRE

ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES REPONSES ECOPHYSIOLOGIQUE ET MOLECULAIRE ASSOCIEES AU TRANSPORT D'EAU DANS LA FEUILLE DE PEUPLIER NOIR EN CARENCE HYDRIQUE

Jury
Rapporteurs :
Dr. Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT, UMR EEF, Champenoux
Dr. Thierry SIMONNEAU, UMR LEPSE-INRA Supagro, Montpellier
Dr. Marc VILLAR, UR AGPF, Orléans (président du jury)

Examinateurs :
Dr. Valérie PUJADE-RENAUD, UMR 547 PIAF, Université Clermont Auvergne, Aubière
Dr. Philippe LABEL, URM 547 PIAF, Université Clermont Auvergne, Aubière (directeur de thèse)
Dr. Aurélie GOUSSET-DUPONT, UMR 547 PIAF, Université Clermont Auvergne, Aubière
Dr. Boris FUMANAL, UMR 547 PIAF, Université Clermont Auvergne, Aubière, invité

Remerciements

En rédigeant ces quelques lignes dans mon manuscrit de thèse, je ne peux que me souvenir de l'origine de ma passion pour les sciences. D'aussi loin que je me souvienne, j'ai toujours voulu « découvrir », et très rapidement, j'ai compris qu'il me fallait devenir chercheur afin que ma soif de connaissance ne soit jamais tari. C'est avec émotion que je me souviens du chemin parcouru et des rencontres qui m'ont été offertes. Sans aucuns doutes, je n'aurais pu réaliser tout ce que j'ai pu entreprendre sans ces personnages, tous singulièrement fidèles à eux-mêmes, et je leur en remercie.

A l'équipe de direction, composée de Jean-Louis JULIEN, Bruno MOULIA, Valérie LEGUE, Hervé COCHARD et Nicolas DONES, qui m'a accueilli au sein du laboratoire PIAF et par là m'a donné la chance de réaliser mon rêve. Je tiens bien évidemment à remercier mes rapporteurs et examinateurs de thèse qui ont accepté de relire et valider mon travail de thèse : Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT, Valérie PUJADE-RENAUD, Thierry SIMONNEAU et Marc VILLAR.

A mon directeur de thèse, Philippe LABEL, et mes encadrants, Aurélie GOUSSET-DUPONT et Boris FUMANAL. Une grande aventure, riche en apprentissage, qu'a été cette thèse auprès de vous. J'ai apprécié ce que chacun d'entre vous a su m'apporter, je pense à la folie des statistiques que j'ai développée au contact de Philippe, l'expérience tortueuse de l'expérimentation en parcelle avec Boris et l'art de la diplomatie avec Aurélie. Merci Aurélie de m'avoir fait confiance depuis mon M1 et à tous de m'avoir permis d'effectuer un peu d'enseignement durant ces trois ans. Je ressors de ces expériences grandie et prête à n'importe quelle épreuve.

Je remercie chaudement Stéphanie MASSEY, Caroline SAVEL et Céline SAC de leur soutien technique inconditionnel mais pas seulement. Merci pour ces moments partagés autour d'un peuplier, d'un eppendorf, d'un thé ou d'une bière ! Votre soutien dans certaines épreuves m'ont été précieux, comme celui d'anciens doctorants et de futurs docteurs. Je pense aux deux compères ex-doctorants Eric et Razik qui m'ont un jour accueilli dans leur QG. A ce moment là, je ne pouvais pas savoir à quel point leur présence me serait essentielle dans mon quotidien au labo. Je n'oublie pas Lise très récemment nommée docteure et avec qui j'ai pu partager des moments inoubliables à la fois à l'IUT d'Aurillac et à la fois au labo. Et bien sûr,

merci à la petite Julietta, comparse de bureau, qui a due me supporter durant les derniers mois « magiques » de la thèse. Merci à tous les membres du labo pour m'avoir apporté votre soutien que je n'oublierais pas. Je ne remercierais jamais assez les stagiaires motivés que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui ont fournis un travail exemplaire : Romain, Pierrick, Benjamin, Yvann, Adrien, Coraline et Amadou. Dans la lignée des très bons souvenirs à garder, j'espère conserver en mémoire les moments de travail intense et les tranches de rigolade que j'ai pu avoir avec vous tous.

Ce travail de thèse a été concrétisé en grande partie grâce au soutien inconditionnel que j'ai reçu de mes parents, ma sœur et mon Jérémy, au travers de leur bonne humeur, de leur ouverture d'esprit, de leur curiosité, de leur rationalité et de leur courage. Ils sont mes exemples et sont ce qui me rapproche de ma vérité : « Celui qui ne sait pas d'où il vient ne peut savoir où il va, car il ne sait pas où il est ». Je dédie donc ce manuscrit de thèse à ma famille, et particulièrement à une personne qui a été une de mes plus grandes pertes jusqu'à présent…

A ma grand-mère Marie-Jeanne,

SOMMAIRE

Liste des principaux sigles et abréviations 4
Liste des principaux sigles et abréviations (suite) 5

CONTEXTE DE L'ETUDE 6

1. Le changement climatique 7
   1.1. Une transition climatique 7
   1.2. L'évolution des aires de répartition des espèces végétales 7
   1.3. Les conséquences écologiques et économiques des sécheresses 9
2. Le peuplier 10
   2.1. Les peuplements naturels du genre *Populus* 10
   2.2. La production et la valorisation du peuplier 11
   2.3. Les enjeux écologiques du peuplier 12
   2.4. Le peuplier, un modèle d'étude récent 12
3. Présentation du plan de thèse 13

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 14

1. L'espèce modèle : *Populus nigra* 15
   1.1. Le système de ramification 15
   1.2. Les caractéristiques foliaires 15
2. Le transport de l'eau dans la plante 17
   2.1. Les mouvements d'eau dans la plante 17
   2.2. Les lois physico-chimiques régulant les flux d'eau foliaire 18
   2.3. La conductance hydraulique foliaire est liée à l'anatomie des feuilles 21
3. L'arbre face au déficit hydrique 22
   3.2. Les modifications métaboliques à l'échelle de la plante lors d'un déficit hydrique 24
   3.4. La régulation des flux d'eau par l'anatomie foliaire 27
      3.4.1. La plasticité anatomique de la feuille 27
      3.4.2. Les ajustements anatomiques en conditions hydriques limitantes 28
   3.5. Les stratégies de réponse au déficit hydrique 30
4. Les régulations moléculaires en réponse au déficit hydrique 32

SOMMAIRE (suite)

4.1. L"étude du transcriptome par RNAseq 32
4.1.1. Le principe du RNAseq 32
4.1.2. L"analyse des données RNAseq 33
4.1.3. Le génome de référence 34
4.1.4. Les particularités du RNAseq 35
4.2. Les principales voies de réponses moléculaires au stress hydrique 36
4.2.1. Le rôle de l"acide abscissique 36
4.2.2. Les rôles des facteurs de transcription 37
4.2.3. Les régulations osmotiques et la stabilisation des macromolécules 39
4.3. La régulation des flux d"eau par les aquaporines 41
4.3.1. Les particularités structurales des aquaporines 41
4.3.2. Les fonctions des aquaporines 42
4.3.3. Les régulations de l"activité des canaux 43
5. La plasticité des réponses au déficit hydrique 45
5.1. La notion de plasticité et son estimation 45
5.2. Les conséquences de la plasticité 46
5.3. L"héritabilité de la plasticité à l"échelle de la population 48
5.4. La régulation génétique de la plasticité 49
5.5. De la plasticité phénotypique à la plasticité transcriptionnelle 50

OBJECTIFS 52

RESULTATS 55

CHAPITRE I 56
LA STRATEGIE ET LA PLASTICITE DE LA REPONSE PHENOTYPIQUE DU PEUPLIER NOIR A LA SECHERESSE 56
CHAPITRE II 79
LA PLASTICITE DES REPONSES PHENOTYPIQUES ET TRANSCRIPTIONNELLES INTEGREES DU PEUPLIER NOIR A LA SECHERESSE 79
CHAPITRE III 116
ETUDE COMPARATIVE DES REPONSES TRANSCRIPTIONNELLES ENTRE NERVURE PRINCIPALE ET LIMBE DE LA FEUILLE DE PEUPLIER NOIR A UNE SECHERESSE 116

SOMMAIRE (suite)

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 142

1. La plasticité des réponses phénotypiques et la stratégie écologique des peupliers en réponse au déficit hydrique 143

1.1. La stratégie de réponses à la carence hydrique progressive jusqu"à sévère varie en fonction des génotypes de peuplier noir 143

1.2. Le niveau de plasticité du phénotype dépend du génotype et des stratégies de réponses 144

2. La plasticité transcriptionnelle dépend du génotype et est en lien avec la plasticité phénotypique d"un génotype donné 146

2.1. Le transcriptome foliaire est fortement modifié en réponse à un déficit hydrique sévère 146

2.2. Les transports cellulaires sont finement régulés en réponse au déficit hydrique par les aquaporines et la voie de transport vésiculaire 147

2.3. La plasticité transcriptionnelle est spécifique du génotype 148

2.4. Des gènes associés à des fonctions cellulaires précises possèdent une plasticité transcriptionnelle spécifique des génotypes 149

2.5. La plasticité des traits phénotypiques peut être associée à la plasticité de l"expression de groupes de gènes 150

3. Les réponses transcriptionnelles sont différentes entre nervure principale et limbe 151

3.1. Le transcriptome de la nervure principale est modulé en réponse au déficit hydrique 152

3.2. Certains transcrits sont spécifiquement régulés dans la nervure principale ... 153

3.3. La régulation de certains transcrits est spécifique du limbe 155

4. Perspectives 156

BIBLIOGRAPHIE 157

Liste des principaux sigles et abréviations

A : assimilation carbonée nette

ABA : Abscissic acid

BSE : Bundle Sheath Extension

C1 to C6 : taux de couverture des nervures d"ordre 1 à 6

Cs, Cp and Ci : taux de couverture des parenchymes lacuneux, palissadique et intermédiaire

D : croissance radiale du rameau

D : densité de stomates

GO: Gene Ontology

gs : stomatal conductance

H : Hauteur des arbres

L : croissance longitudinale du rameau

Lac : taux de couverture des lacunes

Light : nombre moyen de jours ensoleillés par an

Log2FC: expression différentielle (Fold Change) en log base 2

N : nombre de nouvelles feuilles par branche

NIP: Nodulin 26-like Intrinsic Proteins

PIP: Plasma membrane Intrinsic Protein

PM: Plasmamembrane

R : résistance

Rain : nombre moyen de jours pluvieux par an

RDPI : Relative Distance of Plasticity Index

RH : Relative Humidity

RWC : Relative Water Content

SIP: Small basic Intrinsic Proteins

SLA : Specific Leaf Area

SYP: syntaxines

T : variation du nombre total de feuilles

TGN: Trans-Golgi Network

TIP: Tonoplast Intrinsic Proteins

Tr : transpiration foliaire

VAMP : Vesicule Associated Membrane Protein

XIP: X Intrinsic Proteins

θ_{max} : température moyenne annuelle maximale

θ_{min} : température moyenne annuelle minimale

Ψ: potentiel hydrique foliaire

Ψ_{md} : potentiel hydrique foliaire minimum

Ψ_{pd} : potentiel hydrique foliaire de base

Contexte de l'étude

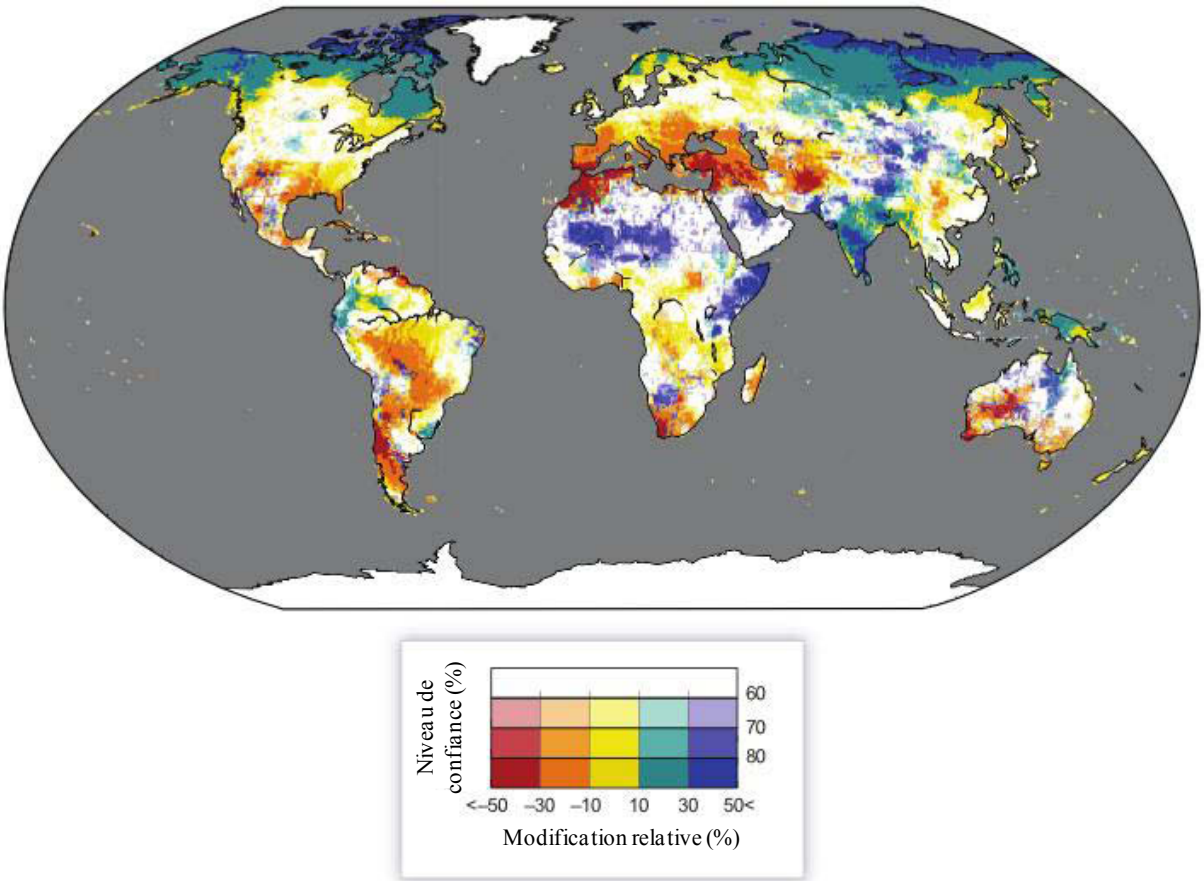


Figure 1. Evolution prédictive des modulations des précipitations suite à une augmentation de 2°C de la température de surface terrestre selon le modèle RCP8.5. Les estimations ont été réalisées avec le Global Hydrological Model dont le niveau de confiance est indiqué. Illustration adaptée de Schewe *et al.* (2013).

1. Le changement climatique

1.1. Une transition climatique

Le climat change régulièrement à la surface de la planète provoquant des extinctions d"espèces animales et végétales, comme en témoignent de nombreuses études paléoclimatiques (Raup and Sepkoski, 1982; Koch and Barnosky, 2006). Au cours des 500 000 dernières années, cinq extinctions massives auraient eu lieu et la 6ème ayant pour cause les changements globaux (dont les changements climatiques) provoqués par l"homme serait en cours (Barnosky *et al.,* 2011). L"analyse des tendances climatiques et des pratiques humaines du siècle dernier permettent la modélisation de la variation future de la température mondiale moyenne et des changements climatiques. La température moyenne de la surface du globe a augmenté de 0,85°C entre 1880 et 2012 (IPCC 2013; Settele *et al.,* 2014). A cette observation s"ajoutent plusieurs autres anomalies climatiques, comme une augmentation des gaz à effet de serre, la fonte prématurée des glaces arctiques, une élévation du niveau de la mer, un accroissement de la durée des vagues de chaleur ou au contraire des pluies diluviennes et l"acidification des océans (Burkett *et al.,* 2014). Ces paramètres ont permis de construire plusieurs modèles qui prédisent tous une augmentation de la température de surface de la planète d"ici une centaine d"années allant de 1,0°C (modèle RCP2.6) à 3,7°C pour le plus pessimiste (modèle RCP8.5; Burkett *et al.,* 2014). En conséquences de ce réchauffement global, la fréquence et l"intensité des évènements climatiques extrêmes sont susceptibles de s"accroître (Beniston *et al.,* 2007; Burkett *et al.,* 2014). Les climats tempérés seront notamment touchés par des modifications hydrologiques majeures provoquant des sécheresses (van Mantgem *et al.,* 2009; Anderegg *et al.,* 2013; Cisneros *et al.,* 2014; Figure 1).

1.2. L"évolution des aires de répartition des espèces végétales

En réponse à ces changements climatiques importants, les aires de répartition de certaines espèces herbacées et arborescentes ont déjà commencé à évoluer avec une tendance de migration vers les pôles (Parmesan and Yohe, 2003; Lenoir *et al.,* 2008). La cause majeure de la modification de ces aires de répartition semble être les changements de température, un facteur influençant notamment la phénologie (Settele *et al.,* 2014). Ce paramètre est un des plus sensibles aux modifications climatiques et l"augmentation des températures provoque un « avancement du printemps » observé chez de nombreuses espèces de différentes régions

tempérées (Menzel *et al.,* 2006; Parmesan, 2007; Primack *et al.,* 2009; Cook *et al.,* 2012; Peñuelas *et al.,* 2013). L'amplitude de variation de la phénologie est dépendante des espèces mais la sortie de dormance est globalement avancée de 2,8 jours par décennie (Parmesan, 2007). Les bouleversements climatiques expliquent les changements de distribution des espèces, notamment au sein des communautés forestières, au travers des modifications de l'abondance des espèces (Cahill *et al.,* 2012; Doxford and Freckleton, 2012) et de la structure de ces communautés (Bertrand *et al.,* 2011; Ruiz-Labourdette *et al.,* 2013). En effet, les interactions biotiques auraient un poids plus important dans la survie de l'espèce que le degré de tolérance physiologique aux modifications environnementales (Cahill *et al.,* 2012).

Depuis quelques dizaines d'années des modèles tentent de prédire l'évolution des aires de répartition des espèces en fonction des scénarios climatiques afin de mettre en place des politiques de préservation de la biodiversité. En cas de bouleversements climatiques, le potentiel de migration dépend de l'espèce concernée. Ainsi, la migration des espèces de succession écologique tardive serait très lente en réponse à une modification environnementale (Meier *et al.,* 2012). Il dépendrait également de la compétition pour les ressources, de la configuration de l'habitat et des conditions précises de modifications environnementales (Meier *et al.,* 2012). Enfin, les variations de réponses inter-spécifiques de l'âge de maturation, de la fécondité et de la méthode de dispersion des graines influenceraient les prédictions de migration (Nathan *et al.,* 2011). La capacité de migration des espèces arborescentes vers les pôles et en altitude serait fondamentale dans leur survie (Dale *et al.,* 2010; Hickler *et al.,* 2012). Les scénarii prédisent une migration des populations de *Fagus sylvatica* endémiques des plaines d'Europe en direction de l'Asie, des pays du Nord de l'Europe et des régions de haute altitude d'ici 2100 (Landmann *et al.,* 2008; Meier *et al.,* 2012; Falk and Hempelmann, 2013). La nouvelle aire de répartition de *Betula pendula* serait identique à celle du hêtre à l'exception d'une plus forte abondance dans les pays du nord de l'Europe (Meier *et al.,* 2012). De façon identique, l'abondance de *Picea abies* augmenterait dans les pays du Nord de l'Europe et les régions de haute altitude mais diminuerait fortement partout ailleurs (Falk and Hempelmann, 2013). Au cours du prochain siècle, certaines espèces végétales pérennes, et notamment celles de grande taille, seront en voie d'extinction en Amérique du Nord (Morin *et al.,* 2008). Parmi elles, *Populus deltoides* et *Populus tremuloides* subiront une faible diminution de population (de l'ordre de 10%) contrairement aux hêtres (de 10% à 20%) et aux chênes (environ 20% et jusqu'à 40% pour *Quercus bicolor*; Morin *et al.,* 2008).

Cependant, certains auteurs soutiennent l"hypothèse d"une modification de l"aire de répartition trop lente face aux modifications environnementales rapides et peu prédictibles (Chmura *et al.,* 2011; Rustad *et al.,* 2012; Settele *et al.,* 2014). Selon cette hypothèse, la survie des espèces dépendra donc de leur capacité de réponses à des perturbations récurrentes de leur environnement (Givnish 1988). En effet, les traits phénotypiques sont modulables selon une plasticité qui leur est propre et dans des limites fixées par l"histoire évolutive de l"espèce et le milieu (Nicotra *et al.,* 2010). La plasticité phénotypique serait donc essentielle dans la réponse des plantes en général et *a fortiori* des plantes pérennes telles que les arbres face aux changements climatiques. Les modèles de prédictions d"aires de répartition sont encore perfectibles car beaucoup ne prennent pas en compte des paramètres pourtant indispensables, comme les interactions entres espèces (Hughes, 2000; Suttle *et al.,* 2007; Van der Putten *et al.,* 2010; Wisz *et al.,* 2013), la plasticité des traits (Parmesan and Hanley 2015) et l"évolution des relations entre traits (Angert *et al.,* 2013) dans un environnement qui ne possède pas son équivalent actuel.

1.3. Les conséquences écologiques et économiques des sécheresses

L"accumulation de CO_2 atmosphérique est un facteur favorisant la croissance en diamètre des troncs de nombreuses essences forestières eurasiennes (Briffa *et al.,* 2008) et tropicales (Phillips *et al.,* 2009). La fixation du CO_2 par les forêts est fondamentale dans le cycle global du carbone (Settele *et al.,* 2014) puisqu"elle permet de limiter la concentration de gaz à effet de serre et l"amplification du phénomène de réchauffement global (Pan *et al.,* 2011). Cependant, depuis les années 1980, une importante variabilité de la croissance radiale a été mise en évidence dont la cause serait des évènements ponctuels de sécheresse intense (Wilson *et al.,* 2007; Phillips *et al.,* 2009). A cela s"ajoute la réduction de la photosynthèse impliquant une réduction de la fixation de carbone pendant la période de déficit hydrique. Les hêtraies françaises sont particulièrement touchées par ces déficits hydriques et présentent des ralentissements de croissance (Charru *et al.,* 2010). Des épisodes de sécheresse particulièrement intenses et longs peuvent engendrer des dommages irréversibles pouvant aller jusqu"au dépérissement des forêts (Bréda *et al.,* 2006) en régions tempérées (van Mantgem *et al.,* 2009; Anderegg *et al.,* 2013), tropicales (Phillips *et al.,* 2009) et boréales (Peng *et al.,* 2011). Ce genre de phénomène a déjà été observé en France suite à la sécheresse de 2003 (Bréda *et al.,* 2004). Des parcelles entières de jeunes peupliers d"Aquitaine et du nord-est de la France ont été décimées et la croissance des peupliers les plus matures a été

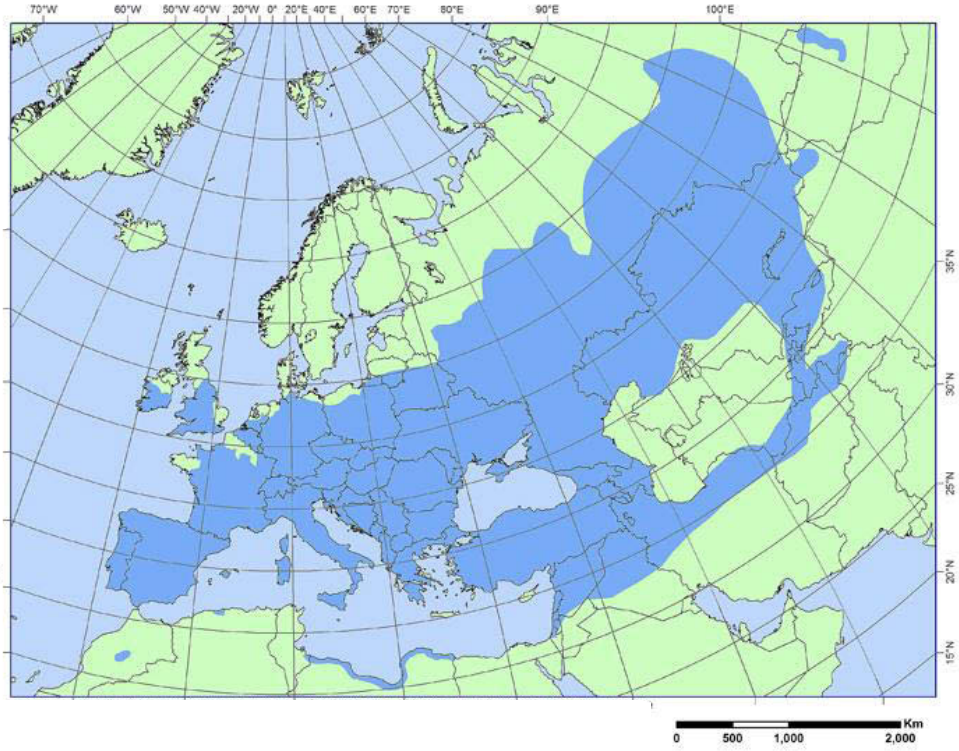


Figure 2. Carte de l'aire de répartition actuelle de l'espèce *Populus nigra* en Eurasie (European forest genetic resources program, Euforgen, 2015).

ralentie sur plusieurs années induisant des pertes économiques importantes (Rebetez *et al.,* 2006). De plus, la sensibilité aux attaques des pathogènes semble être augmentée chez les arbres ayant subi un stress hydrique important, ce phénomène a été observé notamment chez *Populus tremuloides* dont la disparition est amorcée dans les régions d"Amérique du Nord (Worrall *et al.,* 2013). Les évènements de sécheresse constituent donc un important facteur influençant l"aire de répartition des espèces pérennes. La gestion des conséquences de tels impacts reste un défi pour les producteurs forestiers qui décident aujourd"hui des essences à exploiter qui ne seront récoltées que dans des dizaines d"années.

2. Le peuplier

2.1. Les peuplements naturels du genre *Populus*

Les plantes du genre *Populus* appartiennent à la famille des *Salicaceae* de strate arborescente. Les peupliers peuvent atteindre 45 mètres de haut et 3 m de diamètre en 200 à 300 ans. Leur feuillage est caduc, simple et à phyllotaxie opposée. Les feuilles peuvent être dentelées ou lobées (Isebrands and Richardson 2014). Les peupliers sont dioïques, héliophiles et majoritairement pionniers (Rameau *et al.,* 1989). Ces espèces sont capables d"occuper une grande variété d"habitats écologiques aussi bien en peuplements monospécifiques qu"en association avec des conifères ou des Angiospermes arborescents (Isebrands and Richardson 2014). Ils sont généralement retrouvés dans des écosystèmes humides et en particulier aux abords des écosystèmes aquatiques continentaux, des latitudes du Nord jusqu"aux tropiques.

Quatre-vingt-cinq espèces de peupliers ont été identifiées en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique du Nord, au Mexique et en Asie centrale. La plus grande diversité naturelle de peuplier se trouve en Chine (Fang and Skvortsov, 1999; FAO, 2009). Quelques peuplements naturels (environ 39 800 ha), principalement constitués de *P. tremula* et de *P. nigra*, subsistent en France (Service du Patrimoine Naturelle, FAO, 2008). En effet, *P. tremula* est retrouvé sur l"ensemble de l"hexagone excepté les bords de la Méditerranée, l"Aquitaine et la région Poitou-Charentes. L"aire de répartition naturelle du peuplier noir s"étend de l"Ouest de l"Europe jusqu'à l"Ouest de l"Asie avec quelques localisations en Afrique du Nord (Maroc, vallée du Haut Atlas) (Cagelli and Lefèvre, 1995; Figure 2). En France, les peuplements naturels de *P. nigra* sont présents dans la vallée de la Loire, dans la moitié sud et à l"est (Villar 2011). Les ripisylves et les forêts alluviales constituent des milieux humides propices au développement et à la croissance du peuplier noir à caractère

mésohygrophile (Isebrands and Richardson 2014). Il peut atteindre 25 à 30 m dans des milieux bien ensoleillés (Rameau *et al.,* 1989). Cette espèce appartient à un modèle évolutif intermédiaire à la stratégie R et K. Effet, elle possède une croissance rapide et est pionnière notamment sur substrat sec, caractéristiques de végétaux de stratégie R (Rameau *et al.,* 1989). Ces particularités évolutives sont combinées à d"autres appartenant à la stratégie K : une maturité de reproduction sexuée tardive, une longévité importante et une fécondité faible. Son pouvoir colonisateur est directement relié à la dynamique des rivières (Cagelli and Lefèvre 1995). La dissémination de l"espèce s"effectue par multiplication végétative (bouturage naturel de portions de branches le long des rivières) et par reproduction sexuée au bout de 6 à 10 ans. Ces peuplements endémiques côtoient des populicultures constituées majoritairement d"hybrides *P. deltoides x P. nigra* communément appelés *P. euramericana*.

2.2. La production et la valorisation du peuplier

Populus nigra a été longtemps une espèce forestière cruciale exploitée comme bois de chauffage et pour la construction des charpentes. Les hybrides *Populus euramericana*, créés en France en 1755 (Dickmann 2006), ont rapidement remplacé les cultures de peuplier noirs endémiques dont la production de bois était plus faible et inconstante par rapport à celle des hybrides. A partir de ce moment, le peuplier noir a été uniquement utilisé comme ressource pour l"amélioration génétique au travers des croisements, pour sa rusticité, sa capacité d"enracinement dans des sols de texture et de structure variables et sa résistance aux maladies (Cagelli and Lefèvre 1995). Au cours des années 1990, 63% des hybrides créés dans les programmes d"amélioration végétale avaient pour parent le peuplier noir (Viart 1992). Le peuplier noir constitue donc une ressource génétique cruciale en plantations forestières.

Les débouchés économiques du peuplier comme bois d"œuvre sont multiples car celui-ci est très malléable : emballage, contreplaqué, pâte à papier, charpente, mobilier. Aujourd"hui, la France est le deuxième producteur mondial de peuplier (236 000 ha donnant 1.4 millions m^3 de bois) après la Chine (4.3 millions d"ha; FAO, 2008). Les hybrides actuels utilisés en agroforesterie (principalement *P. euramericana*) sont dotés de croissances longitudinale (2 m par an) et radiale (7 à 10 cm par an) rapides dues à l"effet d"hétérosis ce qui permet de valoriser le bois sur un cycle de 15 ans. Avec le développement de la filière bois énergie, des modes de production en taillis de courte rotation (6 à 8 ans) montrent de très bons résultats dans la production de granulés de bois de chauffage.

2.3. Les enjeux écologiques du peuplier

Le peuplier noir est une espèce dominante des forêts alluviales qui contribue à leur biodiversité. Il possède un système racinaire pivotant qui stabilise la structure du sol alluvionnaire, limite l'érosion des berges et permet la conservation des ripisylves. Certaines populicultures sont utilisées dans les programmes de phytoremédiation pour le stockage des métaux lourds dans les vacuoles, et dans la valorisation des boues de stations d'épurations, utilisées comme engrais (Ball *et al.,* 2005), permettant d'améliorer la gestion des déchets chimiques et organiques.

Les forêts alluviales sont des zones tampons à l'interface de la rivière et des espaces anthropisés qui stockent l'azote et le phosphore inorganique, notamment grâce à la contribution du peuplier noir (Naiman and and Décamps 1997). Cependant, ces milieux, dont dépend le peuplier noir, sont menacés par l'activité anthropique au travers des déboisements et d'aménagements agricoles (Michel 2009).

Depuis quelques décennies, le peuplier noir d'Italie, *Populus nigra* var *italica*, probablement issu de la mutation spontanée d'un génome de peuplier noir en Asie centrale (Cagelli and Lefèvre 1995), s'est rapidement acclimaté à l'Europe et vient concurrencer la variété locale française *P. nigra* var *betulifolia* (Isebrands and Richardson 2014). Une introgression de gènes de peuplier noir d'Italie et de peupliers hybrides (*P. deltoides x P. nigra*) dans le fond génétique riche du peuplier noir autochtone a été mise en évidence (Benetka *et al.,* 1999). Par conséquent, les peuplements natifs de peupliers noirs des régions de l'Europe de l'Ouest ont quasiment disparu. Des programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir et de son habitat ont été engagés durant les années 1990 au travers des réseaux européens EUFORGEN et EUROPOP. Au même moment, le Ministère de l'Agriculture français a mis en place un Programme National de Conservation des Ressources Génétiques Forestières. Ceci a permis une conservation *in situ* dans des Réserves Naturelles et une conservation *ex situ* d'environ 2000 individus provenant de différents bassins versants français dans un *populetum* (Guéméné-Penfao).

2.4. Le peuplier, un modèle d'étude récent

Sa capacité de croissance et le séquençage du génome de *Populus trichocarpa* font du peuplier une espèce modèle dans l'étude des réponses physiologiques des arbres aux stress

biotiques et abiotiques (Bradshaw *et al.,* 2000, Taylor 2002). Le séquençage du génome de *Populus trichocarpa* est revu régulièrement afin d'éliminer les erreurs de séquençage antérieures et d'affiner sa structure génétique, notamment grâce aux nouvelles techniques de séquençage (Next Generation Sequencing, NGS) comme le RNAseq (cf. section 4.1.). Actuellement, le génome est à sa troisième version d'annotation fonctionnelle des structures géniques identifiées. Il possède un génome diploïde de 485 Mpb, 45 555 gènes nucléaires répartis dans 19 chromosomes, 153 gènes plastidiques et 73 013 transcrits.

3. Présentation du plan de thèse

L'ensemble des travaux de thèse se sont déroulés au sein de l'UMR PIAF « Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier » INRA-Université Clermont Auvergne à Clermont-Ferrand. La thèse exposée dans ce document s'inscrit dans deux problématiques du laboratoire : l'adaptation des organismes et des populations à leurs milieux et l'impact du changement climatique sur les écosystèmes anthropisés. Cette thèse s'intéresse à la variabilité des réponses phénotypiques et transcriptionnelles du peuplier noir en carence hydrique dans le cadre des régulations hydriques foliaires. Le document débute par une synthèse bibliographique qui introduit les connaissances fondamentales sur : les caractéristiques phénotypiques du peuplier noir, les modalités du transport de l'eau dans la plante, les réponses phénotypiques et moléculaires des arbres à un déficit hydrique et la plasticité des réponses. Les résultats des travaux menés sont ensuite présentés en trois chapitres portant sur l'étude de la stratégie et la plasticité de la réponse phénotypique du peuplier noir à la sécheresse (Chapitre I), la plasticité des réponses phénotypiques et transcriptionnelles intégrées du peuplier noir à la sécheresse (Chapitre II) et l'étude comparative des réponses transcriptionnelles entre nervure principale et limbe de la feuille de peuplier noir à une sécheresse (Chapitre III). Enfin, la discussion et les perspectives reprennent les apports fondamentaux de la thèse dans la compréhension des régulations et des plasticités phénotypique et moléculaire des peupliers noirs en situation de déficit hydrique sévère.

Synthèse bibliographique

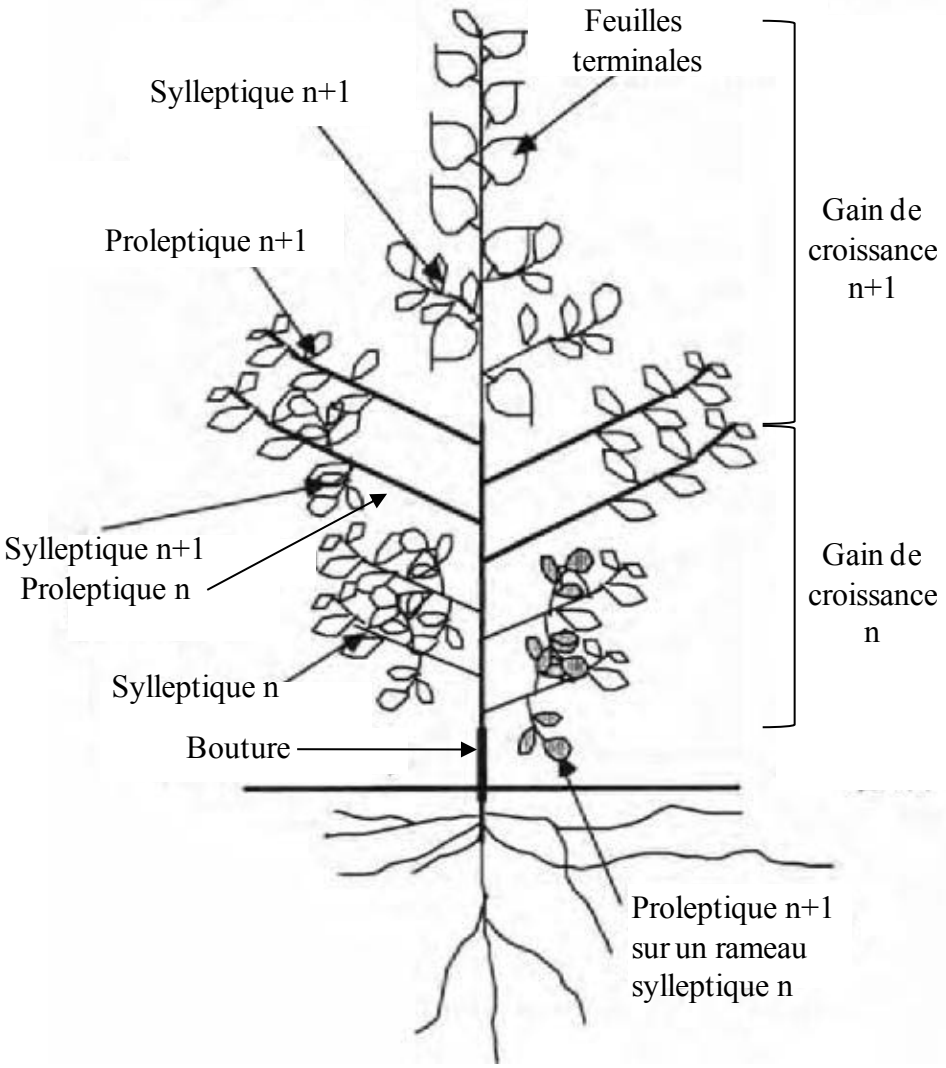


Figure 3. Mise en place des rameaux chez un peuplier noir âgé de 2 ans. La bouture d'une tige de peuplier noir est plantée à l'année n. Les bourgeons émergeant de la bouture forment des rameaux sylleptiques. Les rameaux mettent en place des bourgeons qui subissent l'endurcissement de l'hiver. A l'année suivante (n+1), le débourrement permettra le développement de rameaux proleptiques le long de l'arbre. Des nouveaux bourgeons vont émerger des rameaux sylleptiques. Illustration modifiée de Wu et Hinckley, 2001.

1. L'espèce modèle : *Populus nigra*

1.1. Le système de ramification

La couronne du peuplier est mise en place via deux schémas de débourrement formant soit des rameaux sylleptiques, soit des rameaux proleptiques (Hallé *et al.,* 1978; Ceulemans *et al.,* 1990; Wu et Hinckley, 2001). Le peuplier possède la particularité d'avoir ces deux formes de ramifications dont la morphogénèse est différente (Tomlinson 1983). Tout type de bourgeon qui a subit une phase de dormance, conséquence de l'endurcissement au froid de l'hiver, permettra la formation d'une branche proleptique à la suite de son débourrement au printemps (Figure 3). Les bourgeons axillaires se mettent en place pendant tout le cycle de végétation du peuplier (4 mois par an environ) et donneront dans la même saison de végétation des rameaux dits sylleptiques. Il a été observé que les rameaux sylleptiques possèdent une forte variabilité de croissance et de développement en fonction de leur environnement (Villar 2011). Au contraire, les branches proleptiques issus de bourgeons proches de la branche principale et des branches latérales forment l'architecture à long terme de la couronne de l'arbre. Les branches sylleptiques jouent un rôle dans la maximisation de la productivité de la couronne (Ceulemans *et al.,* 1990).

1.2. Les caractéristiques foliaires

La formation des feuilles s'effectue en cycles réguliers en zone tempérée dans des conditions de milieu non-limitantes. La mise en place des feuilles des plantes pérennes s'effectue selon des étapes successives de croissance et de développement. Le degré de maturité d'un organe foliaire peut donc être déterminé grâce au Leaf Plastochrone Index (LPI, Erickson et Michelini, 1957; Maksymowych, 1973). Il correspond à l'interval de temps permettant l'initiation (ou tout autre état physiologique) de deux feuilles successives. Chez le peuplier noir, dont les feuilles les plus anciennes préformées dans le bourgeon avant débourrement ont une morphologie différente des feuilles nouvellement développées, dites néoformées, le LPI est cependant difficile à déterminer. Le feuillage est hétérophile, c'est-à-dire constitué de feuilles de caractéristiques morphologiques différentes. Effet, les feuilles préformées sont petites, deltoïdes et grossièrement dentées alors que les feuilles néoformées sont plus larges, ovoïdes ou deltoïdes avec des dents plus fines. Malgré ces différences morphologiques, ces deux types de feuilles possèdent une structure tissulaire, ou anatomie, similaire qui découle du développement puis de la croissance de chaque tissu foliaire.

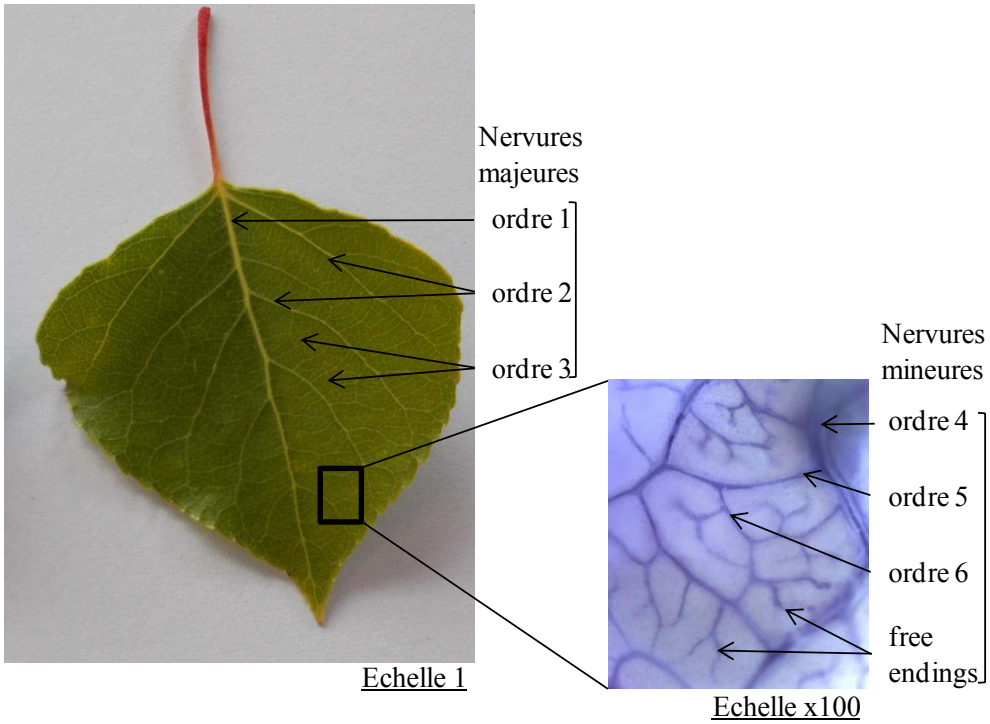


Figure 4. Structure nervaire d'une feuille de peuplier noir. Les nervures majeures, plus longues et plus larges, conduisent la sève brute jusqu'aux nervures mineures plus fines et courtes. Coloration au bleu de Toluïdine (0.5%). Photo personnelle.

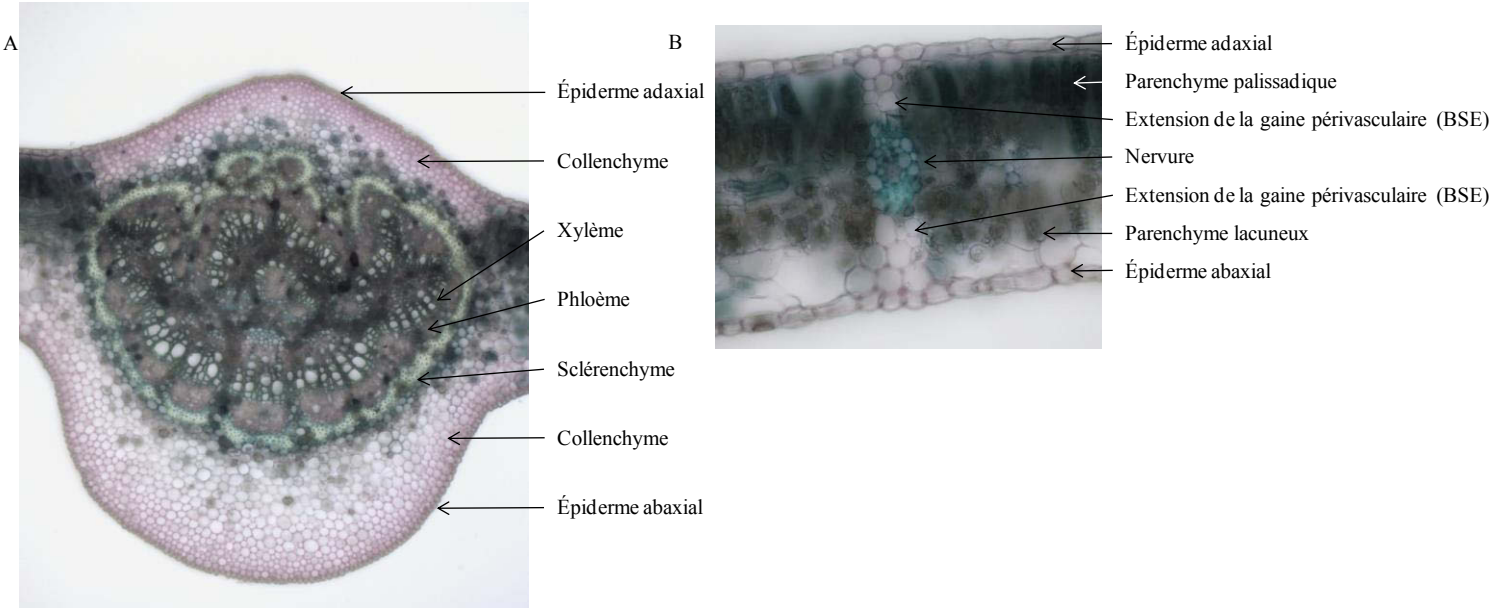


Figure 5. Anatomie de la feuille de peuplier noir. (A) La structure tissulaire complexe de la nervure principale s'agence en cinq principaux tissus. (B) Les nervures les plus petites sont immergées dans le mésophylle et entourées d'une gaine périvasculaire et de son extension (Bundle Sheath Extension ou BSE). Coloration au carmino-vert. Photographies personnelles.

Les feuilles émergeant des bourgeons de peupliers sont recouvertes d"un mucus protecteur qui limite les attaques de pathogènes et réduit l"augmentation de température de surface. La feuille plus âgée est partiellement isolée des fluctuations des conditions extérieures grâce à une couche cireuse recouvrant ses deux faces. La face inférieure ou abaxiale est également recouverte de trichomes simples en faible quantité. Ceux-ci permettraient de créer un micro-environnement de surface afin de réguler la transpiration cuticulaire et la température de surface foliaire (Wagner 2004). Chez *Populus tremula x alba*, l"augmentation de la densité de trichomes est concomitante à un accroissement de la capacité de photosynthèse, la production de biomasse mais aussi la résistance aux insectes (Plett *et al.,* 2010). En effet, l"augmentation de la densité de trichomes bouleverserait la composition de la couche limite à l"interface feuille-atmosphère : le taux de transpiration foliaire et la concentration en CO_2 augmenteraient tout en favoriserant le processus de photosynthèse. Les feuilles de *P. nigra* sont amphistomatales (stomates sur les deux faces de la feuille) mais possèdent une quantité de stomates plus importante sur leur face abaxiale.

La structure interne des feuilles est constituée de nervures et de parenchymes (Figure 4 et 5) ayant respectivement une fonction de conduction et une fonction assimilatrice. Les fonctions de conduction sont assurées par le xylème et le phloème des nervures qui transportent la sève brute et la sève élaborée. Le système de nervation des Angiospermes, *a fortiori* celui du peuplier noir, est très développé et sous forme d"un maillage serré. L"organisation des nervures suit une hiérarchisation selon un gradient de longueur et de diamètre (Figure 4). On distingue les nervures majeures (d"ordre 1 à 3), plus longues et plus épaisses que les nervures mineures (d"ordre supérieur à 4). L"extrémité du système nervaire est constituée de nervures très fines et courtes, nommées « free endings », qui débouchent directement dans le mésophylle. La structure des nervures est très conservée permettant le calcul du diamètre des nervures grâce à la loi de Murray : $r_k^2 = \sum r_{k+1}^2$. Le diamètre *r* au carré d"une nervure d"ordre *k* est égal à la somme des carrés des diamètres des nervures d"ordre inférieur *k+1* (Price *et al.,* 2013). Les nervures peuvent être entourées d"une assise cellulaire appelée la gaine périvasculaire (Sack et Scoffoni, 2013). Une extension de cette assise peut se prolonger au sein du mésophylle et est constituée de cellules non-chlorophylliennes, partant de la nervure en direction de l"épiderme (Bundle Sheath Elements ou BSE ; Figure 5). Les Angiospermes arborescents, tels que le peuplier qui possèdent ce genre de structure sont dits hétérobariques (Terashima 1992). L"extension de la gaine périvasculaire constituerait entre autre un soutien mécanique de la structure interne de la feuille (Wylie 1952). Les nervures majeures sont entourées de sclérenchyme, un tissu lignifié qui permet de soutenir l"ensemble

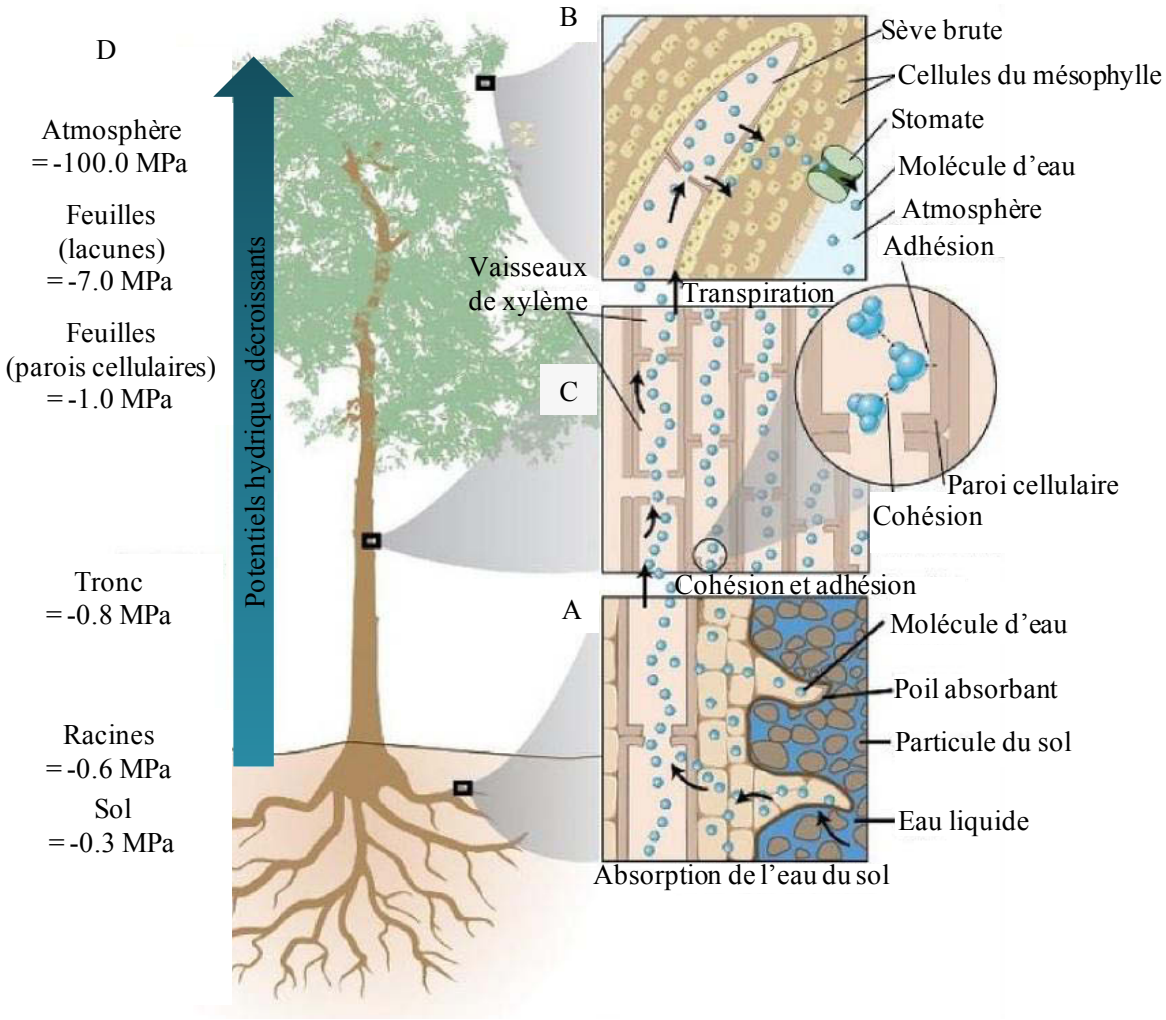


Figure 6. Transport de l'eau au sein du continuum sol/plante/atmosphère. (A) L'eau traverse les poils absorbants racinaires. (B) Le moteur principal du flux d'eau est la transpiration foliaire. (C) Les vaisseaux de xylème permettent son transport des racines jusqu'aux feuilles en partie grâce à la cohésion des molécules d'eau entre elles et à leur adhésion aux parois des cellules. (D) Le flux hydrique continu s'effectue selon un gradient de potentiels hydriques décroissants. Illustration adaptée de McElrone *et al.*, 2013.

du squelette de la feuille (Figure 5A). En dehors des nervures, on retrouve deux parenchymes chlorophylliens, le lacuneux et le palissadique, qui composent le mésophylle (Figure 5B). Le premier permet entre autre la circulation de l"eau des nervures vers les stomates, et de carbone gazeux atmosphérique des stomates vers les plastes du parenchyme palissadique. Le second constitue la zone principale de fixation du carbone gazeux en carbone organique. La fixation de carbone s"effectue grâce à la photosynthèse qui utilise l"énergie photonique collectée par les antennes photosynthétiques, de l"eau et du CO_2 pour fixer le carbone dans des sucres via le cycle de Calvin. L"ouverture stomatique permettant l"entrée de CO_2 par les stomates induit une sortie d"eau sous forme gazeuse que l"on appelle la transpiration foliaire. Les Angiospermes possèdent la capacité de fixation de carbone la plus forte du règne végétal tout en limitant les pertes en eau par transpiration. Ceci est le résultat d"une efficacité d"hydratation de l"ensemble des tissus générée par une ramification et une densité de nervures importantes (Boyce *et al.,* 2009; Sack et Scoffoni, 2013). La feuille est donc un organe stratégique qui est le siège (i) de la synthèse de molécules carbonées, source de croissance et de développement de la plante, et (ii) de la transpiration foliaire, le moteur principal du flux d"eau dans la plante.

2. Le transport de l"eau dans la plante

2.1. Les mouvements d"eau dans la plante

Les plantes sont constituées à 70% d"eau, élément fondamental au bon fonctionnement cellulaire. La sève brute est principalement constituée d"eau et de nutriments dont la concentration évolue avec les conditions du milieu et les besoins de la plante (Peoples *et al.,* 1986; Dambrine *et al.,* 1995). Elle traverse les systèmes racinaires et caulinaires en partie grâce aux vaisseaux conducteurs du xylème présents dans l"ensemble des organes végétaux (Figure 6A-C). L"eau contenue dans les vaisseaux est soumise aux lois de la mécanique des fluides : plus le diamètre des vaisseaux est faible, plus les forces de frottement s"exerçant contre les parois augmentent et plus le débit d"eau diminue.

Le mouvement de l"eau à longue distance est principalement stimulé par la transpiration foliaire (Cruiziat et Tyree, 1990; Figure 6B). Ce phénomène nécessite le changement d"état de l"eau de liquide à gaz. La dissociation des molécules d"eau s"effectuerait entre la gaine périvasculaire et la chambre sous-stomatique (Farquhar et Raschke, 1978; Rockwell *et al.,* 2014). Elle génère une tension hydrostatique correspondant à

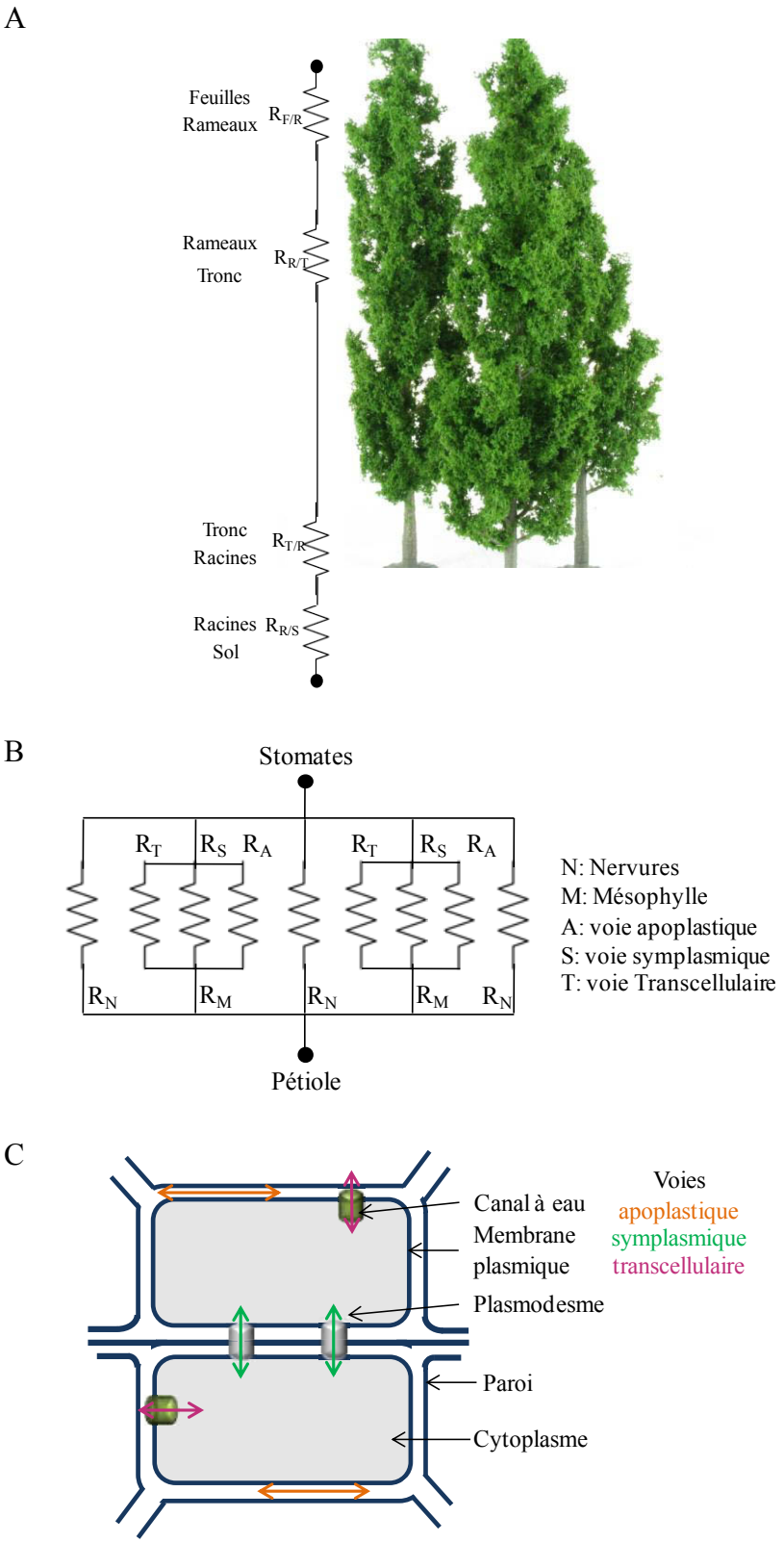


Figure 7. Localisation des résistances s'opposant au passage de l'eau dans la plante.
(A) Les résistances majeures (R) sont identifiées à chaque jonction entre organes formant un circuit en série. (B) Dans la feuille, l'eau emprunte un système de nervation redondant ainsi que les tissus mésophyliens. Un circuit en parallèle représente donc les résistances foliaires. (C) Trois voies permettent la circulation de l'eau au sein du mésophylle. Les voies symplasmique et transcellulaire combinées constituent la voie de transport de cellule à cellule.

la force de cohésion des molécules d"eau le long de la colonne d"eau, des feuilles jusqu"aux racines (Figure 6C). A cela s"ajoute une tension gravimétrique, autrement dit une décroissance du potentiel hydrique dans la plante due à la gravité qui reste négligeable par rapport à la tension hydrostatique (Cochard et Granier, 1999; Figure 6D). La transpiration foliaire est en grande partie responsable de l"absorption de l"eau par les poils absorbants et de l"alimentation hydrique de chaque compartiment cellulaire de façon continue. La quantité d"eau délivrée à la plante est donc étroitement dépendante des conditions hydriques du sol et de l'humidité relative atmosphérique.

2.2. Les lois physico-chimiques régulant les flux d"eau foliaire

L"ensemble des compartiments traversés par l"eau oppose une certaine résistance à son passage ce qui permet d"assimiler le système vasculaire des plantes à un circuit électrique (M. H. Zimmermann 1983). Le flux d"eau dans la plante entière se rapporterait à un circuit en série (Figure 7A).

La pression du xylème demeure constante au sein du tronc et des branches mais est différente au sein des feuilles. Ceci implique que la jonction tige-pétiole constitue un point clé de régulation du flux de sève (Cruiziat *et al.,* 2002). Plusieurs études ont montré l"importance de la résistance des feuilles au passage de l"eau évaluée entre 30% et 80% de la résistance de la plante entière (Nardini *et al.,* 2001; Brodribb *et al.,* 2002; Sack et Holbrook, 2006). Le niveau de résistance varie selon les espèces suggérant des régulations hydriques dépendantes des conditions environnementales de chacune (Sack et Holbrook, 2006). Il a été montré par exemple, chez *Prunus laurocerasus*, que l"obstruction de la nervure principale de la feuille induisait une perte de seulement 30% de la résistance hydraulique foliaire laissant ainsi supposer que la résistance hydraulique foliaire est localisée majoritairement en dehors de cette nervure. Le système de répartition de l"eau dans le limbe s"apparente donc à un circuit en parallèle garant de son hydratation continue en cas de dommages du système circulatoire (Figure 7B).

Trois voies de diffusion facilitant le passage de l"eau sous forme liquide des vaisseaux aux cellules foliaires peuvent être distinguées: la voie apoplastique, la voie symplasmique et la voie transcellulaire du mésophylle (McElrone *et al.,* 2007; Figure 7C). La première voie désigne le passage de l"eau par l"apoplasme, c"est-à-dire l"espace extracellulaire à travers les parois pectocellulosiques des cellules. La seconde permet le transport de l"eau par le symplasme : continuum de diffusion entre les cytoplasmes des cellules via des plasmodesmes.

La voie transcellulaire du mésophylle concerne la diffusion de l"eau au travers des membranes des cellules de la feuille. La diffusion de l"eau par cette voie peut être facilitée par des canaux spécifiques comme les aquaporines (cf. section 4.3.). Or, il a été montré que les phases liquide et gazeuse de l"eau coexisteraient entre la gaine périvasculaire et la chambre sous-stomatique dans des proportions qui dépendraient du tissu foliaire (Buckley 2015). En effet, la phase gazeuse représenterait près de 30% de la conductance de l"eau dans le parenchyme lacuneux et environ 20% dans le parenchyme palissadique (Buckley 2015). Ces proportions sont équivalentes à celles de la phase liquide symplasmique, le reste de la conductance étant assurée par la phase liquide apoplastique. L"hydratation foliaire est donc assurée par ces voies de diffusion liquides et gazeuses combinées à un réseau très développé de nervures majeures et mineures.

Les nombreux tissus foliaires s"opposent au passage de l"eau mais les résistances du xylème et hors xylème dite « cellule à cellule » seraient prépondérantes (Nardini *et al.,* 2001). La part de chacune de ces résistances dans la résistance foliaire totale fait toujours l"objet d"un débat car elle dépend de l"architecture de la feuille (nervation, surface et épaisseur des tissus et de la feuille) et de l"espèce considérée. Chez le noyer, la résistance cellule à cellule constituerait 88% de la résistance foliaire totale (Cochard *et al.,* 2004). En revanche, Buckley (2015) estime, par une approche de modélisation, que la part de la conductance hydraulique foliaire apoplastique serait plus importante que la part cellule à cellule en dehors de la gaine périvasculaire. Néanmoins, l"auteur démontre que la contribution de la voie apoplastique et de la phase gazeuse dans la variation de conductance hydraulique dépend de l"épaisseur des parois cellulaires et du gradient de température à l"intérieur de la feuille. En effet, un gradient de température de seulement 0,02°C du centre de la feuille vers l"épiderme, génèrerait une augmentation d"environ 40% du transport de l"eau au travers du mésophylle. L"architecture de la feuille apparait donc comme un levier crucial déterminant le flux d"eau dans la plante.

Le flux d"eau dans la feuille peut donc être dérivé d"une mesure de la résistance hydraulique mais aussi du gradient de potentiel hydrique (Ψ, MPa; Cruiziat *et al.,* 2002). Le potentiel hydrique caractérise la quantité d"énergie à appliquer pour générer un flux d"eau dans un système, que ce soit un organe végétal, un environnement, un sol ou l"atmosphère. L"eau transite le long d"un gradient de potentiels décroissants (proche de zéro dans le sol, -0,3 MPa et jusqu"à -100 MPa environ dans l"atmosphère). Le potentiel hydrique foliaire résulte de la somme de quatre composantes : $\Psi = P + \pi + \tau + \rho$. Le potentiel hydrostatique ou pression de turgescence (P) correspond à la pression du contenu cellulaire sur la paroi des cellules. Cette force est donc positive et de l"ordre de 0,5 MPa au maximum (Pritchard, 2001).

L'hydratation de la cellule est maintenue grâce à la diffusion facilitée de l'eau au travers de la membrane plasmique, au même titre qu'au travers de la membrane plasmique semi-perméable, sous l'influence de la pression osmotique (π). Cette pression, générée par les solutés du cytosol, provoque l'entrée de l'eau dans la cellule et sa rétention afin d'équilibrer la pression entre les deux compartiments. La cellule peut alors moduler sa quantité d'eau par la concentration en osmolytes. Le potentiel osmotique est toujours négatif, de même que le potentiel matriciel (τ). Ce dernier se rapporte aux forces d'imbibition et de capillarité qui s'exercent sur les molécules d'eau. Enfin, la dernière composante est le potentiel gravitationnel (ρ) qui reste négligeable dès lors que la hauteur de la plante ne dépasse pas dix mètres.

La mesure du potentiel hydrique foliaire permet d'estimer l'état hydrique de la plante (Shackel *et al.,* 1997; Sellin, 1999; Fu *et al.,* 2006; Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010; Barchet *et al.,* 2013). Cette mesure est destructive car elle implique la mise sous pression d'une feuille dans une chambre à pression. Avant le lever du soleil, les plantes, à l'exception des halophytes et des xérophytes, sont en équilibre hydrique avec le sol ce qui sous-entend que leur potentiel hydrique est proche de zéro (Donovan *et al.,* 2001). En conditions hydriques non-limitantes, l'ostiole des stomates s'ouvre dès le lever du soleil grâce à la modification de pression de turgescence des cellules de garde. Celle-ci demeure sous le contrôle d'une batterie de gènes impliqués dans la régulation de gènes de l'horloge interne à la plante sensibles à la qualité et la quantité de lumière reçue, la signalisation par l'acide abscissique, la perception de la concentration en CO_2 et en calcium (Araújo *et al.,* 2011). La conductance stomatique à la vapeur d'eau (gs, mol $H_2O.m^{-2}.s^{-1}$) correspond à la conductance de la diffusion du CO_2 et d'H_2O entre le compartiment atmosphérique et la chambre sous-stomatique. La différence de potentiel hydrique entre ces deux compartiments génère une transpiration foliaire qui augmente progressivement au cours de la journée pour atteindre son maximum au midi-solaire (Barrs, 1971). La transpiration foliaire *E* (mol $H_2O.m^{-2}.s^{-1}$) peut être évaluée de la façon suivante : $E = Kh\ \Delta\Psi = gs\ A\ VPD$ (Brodribb et Holbrook, 2003). La différence de potentiel hydrique foliaire entre tige et feuille $\Delta\Psi$ (MPa) est proportionnelle à la transpiration, la conductance stomatique gs, l'assimililation carbonnée nette A (mol $CO_2.m^{-2}.s^{-1}$) et la pression de vapeur saturante VPD (Vapor Pressure Deficit, kPa). En revanche, l'évolution de la conductance hydraulique foliaire Kh est inverse à celle du $\Delta\Psi$. Le potentiel hydrique foliaire atteint des valeurs minimales proches de -1,7 MPa pour le peuplier noir en milieu de journée (Lambs *et al.,* 2006). L'augmentation de la tension hydrique peut induire une embolie

par la formation de bulles d"air dans certains vaisseaux de xylème qui obstrue les vaisseaux et limite le flux d"eau. La dissémination de ces bulles d"air est fortement limitée grâce à l"élaboration de thylles ou l"obstruction des ponctuations (Cochard et Granier, 1999). Le flux d"eau peut se poursuivre grâce à la redondance des cellules xylémiennes. Ce système circulatoire sectoriel et disjoint constitue une sécurité supplémentaire pour le maintien d"un flux d"eau régulier et rapide chez les Angiospermes (Sack *et al.,* 2008; McKown *et al.,* 2010). Les bulles d"air formées peuvent être résorbées pendant la nuit dans les vaisseaux les plus éloignés du cambium (Pickard, 1989; Zwieniecki et Holbrook, 1998; Holbrook et Zwieniecki, 1999) : les cellules compagnes des vaisseaux de xylème relargueraient de l"eau dans les vaisseaux. L"embolie accumulée tout au long d"une saison de végétation en conditions hydriques non-limitantes (Cochard *et al.,* 1992) peut être résorbée en partie l"année suivante lorsque la poussée racinaire du printemps est plus forte que la pression de capillarité. Plusieurs preuves de cycles journaliers d"élimination d"embolie ont été apportées depuis ces premiers résultats mais sont entachées depuis peu par la découverte de biais expérimentaux importants (Wheeler *et al.,* 2013).

2.3. La conductance hydraulique foliaire est liée à l"anatomie des feuilles

L"anatomie foliaire joue un rôle critique sur la conductance hydraulique foliaire ce qui aurait un impact sur la régulation d"ouverture des stomates (Meidner, 1976; Sack et Holbrook, 2006). La densité des nervures et l'épaisseur des feuilles sont fortement corrélées à la conductance hydraulique foliaire et au maximum de photosynthèse chez les Bryophytes, Lycophytes, Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes (Brodribb *et al.,* 2007). Ainsi, chez les Angiospermes, le fort niveau de hiérarchisation des nervures, énergiquement couteux à mettre en place (McKown *et al.,* 2010), est associé à une conductance hydraulique qui maximise la diffusion de l"eau au travers des tissus et facilite la fixation de carbone par photosynthèse. Ces optimisations auraient été la clé de la colonisation de nombreux milieux par ces espèces (Brodribb *et al.,* 2010). De plus, le flux hydrique foliaire continu et soutenu résulterait d"une optimisation structurale de la feuille (Zwieniecki et Boyce 2014) : la distance entre les nervures est égale à la distance entre les nervures et l"épiderme abaxial (Noblin *et al.,* 2008). Les niveaux de hiérarchisation et de ramification des nervures, estimés par la longueur des nervures par unité de surface foliaire (Vein Lenght per unit of leaf Area, VLA), sont corrélés positivement à la conductance hydraulique foliaire et celle du mésophylle qui s"explique par l"augmentation de proportion de la gaine périvasculaire perméable à l"eau

(Noblin *et al.,* 2008; Sack et Scoffoni, 2013; Zwieniecki et Boyce, 2014; Buckley *et al.,* 2015). En effet, les extensions de la gaine périvasculaire (Bundle Sheath Elements, BSE) réduiraient la résistance hydraulique entre nervures et épidermes chez différentes espèces d"arbre (Buckley *et al.,* 2011). Chez la tomate, l"absence de BSE dans des feuilles de mutants, induit une diminution de la conductance hydraulique foliaire, de la conductance stomatique et de la fixation de carbone (Zsögön *et al.,* 2014). La gaine périvasculaire constituerait donc une zone tampon entre les tissus conducteurs et le mésophylle. Elle serait impliquée dans la régulation des flux hydriques et faciliterait les variations rapides de potentiel hydrique du xylème. Le niveau de conductance hydraulique de la feuille augmenterait avec la proportion de parenchyme lacuneux par rapport au parenchyme palissadique (Sack *et al.,* 2015), et serait ainsi en lien avec la structure anatomique du mésophylle. En effet, plus la distance entre les nervures et l"épiderme abaxial est faible, donc plus le parenchyme lacuneux est fin par rapport au parenchyme palissadique, plus la conductance du mésophylle s"accroit (Buckley *et al.,* 2015). Ainsi, l"anatomie du mésophylle, l"architecture nervaire, la conductance stomatique et la conductance hydraulique foliaire apparaissent intimement liées (Sack *et al.,* 2003; Aasamaa *et al.,* 2005; Brodribb et Jordan, 2011; Carins Murphy *et al.,* 2014; Feild et Brodribb, 2013). Il semblerait donc que l"optimisation morpho-anatomique foliaire des Angiospermes contribuent à maximiser la fixation de carbone tout en minimisant les pertes en eau générée par transpiration (Beerling et Franks, 2010).

3. L"arbre face au déficit hydrique

Une sécheresse édaphique affecte le végétal en fonction de l"intensité, de la vitesse et de la durée du déficit hydrique. On parle de contrainte hydrique lorsque le fonctionnement de la plante est affecté par le manque d"eau mais que les tissus ne subissent pas de diminution de teneur en eau (Lecoeur, 2007). En revanche, un stress hydrique caractérise une plante pour laquelle la quantité d"eau des organes a diminué. Un enchaînement de modifications phénotypiques est classiquement observée chez les Angiospermes lors d"une réponse à un déficit hydrique (Bray, 1997; Chaves *et al.,* 2003; Farooq *et al.,* 2009; Xu *et al.,* 2010; Simonneau *et al.,* 2014). La croissance est rapidement stoppée puis les valeurs des traits physiologiques (potentiel hydrique, conductance stomatique et assimilation carbonnée) diminuent. Enfin, le métabolisme, l"organogenèse et la morphologie sont également impactés. Les perturbations engendrées dans de telles conditions sont détaillées dans les paragraphes suivants.

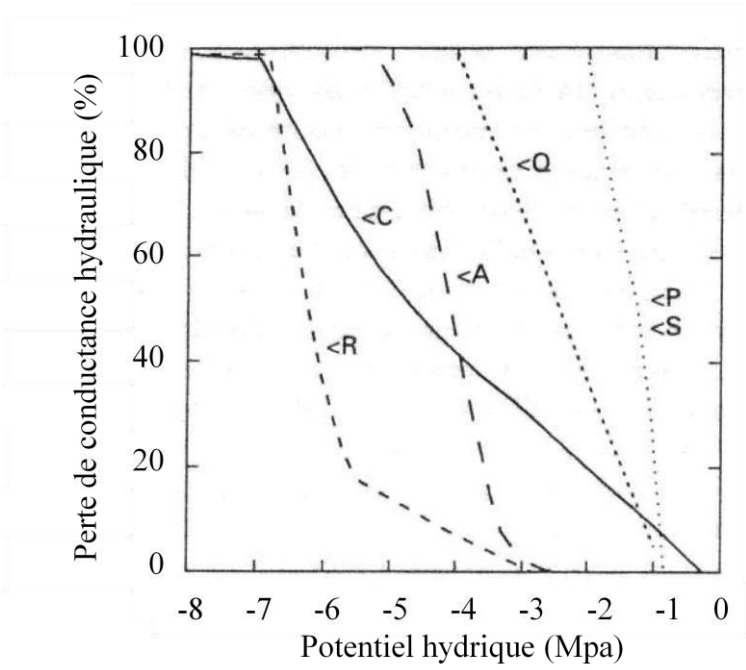


Figure 8. Courbe de vulnérabilité de plusieurs espèces arbustives Angiospermes. A, *Acer saccharum*; C, *Cassipourea elliptica* (Sw.) Poir.; Q, *Quercus rubra* L.; P, *Populus deltoides*; S, *Schefflera morotoni*. Illustration adaptée de Tyree et Ewers (1991).

3.1. La régulation des flux d"eau à l"échelle de la plante lors d"un déficit hydrique

La relation entre la transpiration foliaire et le gradient de potentiel hydrique est linéaire dans des conditions d"irrigation non-limitantes. Cependant, celle-ci est modifiée pendant un stress hydrique suggérant la mise en place de régulations des flux d"eau (Lu *et al.,* 1996; Coupel-Ledru *et al.,* 2014). La réduction de la conductance stomatique, conséquence de la fermeture des stomates est une réponse précoce à une sécheresse édaphique chez les plantes (Stalfelt, 1955; Tardieu et Simonneau, 1998; Marron *et al.,* 2002; Brodribb et Holbrook, 2003; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Araújo *et al.,* 2011). Les pertes en eau par transpiration sont alors limitées, ainsi que l"approvisionnement de la chambre sous-stomatique en gaz carbonique.

La tension dans la colonne d"eau augmente dans l"ensemble de la plante avec l"intensité de la sécheresse (Tyree et Sperry, 1988; Sellin, 1999; Sack et Holbrook, 2006). Le potentiel hydrique foliaire est donc le plus faible au niveau de la feuille, organe à l"interface de l"atmosphère interne et externe à la plante. Le coefficient directeur de la droite des pertes en eau du sol en fonction de la décroissance du potentiel hydrique foliaire dépend du génotype considéré, comme cela a été montré chez *Populus euramericana* (Brignolas *et al.,* 2000). Il s"ensuit une diminution de la conductance hydraulique foliaire ainsi que de la conductance du mésophylle qui limite la diffusion du CO_2 (Flexas *et al.,* 2002; Warren, 2008; Miyazawa *et al.,* 2008; Duan *et al.,* 2009). Dans des conditions où l"intensité de la sécheresse augmente, une perte de turgescence des cellules peut apparaitre indiquant une diminution de la quantité en eau foliaire, autrement dit une déshydratation. La relation entre la perte de conductance hydraulique de la tige d"une espèce ligneuse et le potentiel hydrique suit une sigmoïde appelée courbe de vulnérabilité hydraulique, à partir de laquelle la valeur de potentiel hydrique générant 50% de perte de conductivité (P50) peut être estimée. La P50 du peuplier permet de classer cette espèce parmi les plus sensibles au déficit hydrique par rapport au chêne ou à l"érable, ce qui serait lié à sa nature mésohygrophile (Tyree et Ewers, 1991; Figure 8). La courbe de vulnérabilité de *Populus nigra* révèle une valeur P50 de -0.75 MPa (Lambs *et al.,* 2006) et celle de *Populus deltoides x nigra* une valeur de -1,5 MPa (Barigah *et al.,* 2013). Cette étude indique que la mortalité de ces hybrides coïncide avec un potentiel hydrique de xylème foliaire proche de -1,8 MPa.

3.2. Les modifications métaboliques à l"échelle de la plante lors d"un déficit hydrique

Pendant les premiers jours d"un déficit hydrique croissant, l"assimilation carbonée est maintenue et la quantité de protéines liées à la photosynthèse augmente : kinases, RubisCO activase et protéines du Photosystème II (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Bonhomme *et al.,* 2009). Lorsque la limitation du débit hydrique et des ressources en CO_2 deviennent critiques, la croissance des organes caulinaires chute ainsi que le niveau de photosynthèse (Bray, 1997; Thomas et Eamus, 1999; Caruso *et al.,* 2002; Monclus *et al.,* 2006; Bonhomme *et al.,* 2008; Hamanishi *et al.,* 2012). De plus, l"activité de la RubisCO serait réprimée par des inhibiteurs spécifiques (comme le 2-carboxyarabinitol-1-phosphate) qui s"accumulent en réponse à un manque d"eau (Parry *et al.,* 2002). La quantité de sucres formés diminue malgré la demande métabolique soutenue, ce qui entraine une utilisation des réserves de composés carbonés (Brodribb et Holbrook 2004). Ainsi, le stockage de sucres sous forme d"amidon est stoppé pour permettre la formation d"hydrates de carbones permettant, entre autre, de neutraliser la production d"espèces réactives de l"oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) et de minimiser le stress oxydatif, comme chez *Populus euramericana* et *P. cathayana* (Cao *et al.,* 2013). En cas d"accumulation importante de ROS, le stress oxydatif devient fort et les antennes collectrices des photosystèmes sont dégradées (Cao *et al.,* 2013) de même que certaines enzymes liées au métabolisme carboné et des isoformes de RubisCO activases (Plomion *et al.,* 2006; Feller *et al.,* 2007). Ceci permettrait la mise en réserve de protéines de stockage (Bark Storage Proteins ou BSP) qui constituent une réserve d"azote, utilisable pendant le stress ou conservée en prévision de la croissance générée dès le retour à un état hydrique favorable (Plomion *et al.,* 2006). De plus, les réserves en carbone, notamment sous forme de grains d"amidon, permettraient de subvenir aux besoins de la plante jusqu"à leur épuisement dans le cas d"un stress hydrique progressif, lent et de faible intensité (McDowell *et al.,* 2008; Sala *et al.,* 2010). Il a été montré chez *Populus tremula x alba* en déficit hydrique modéré que la quantité de BSP proches du cambium diminue, ce qui permettrait de maintenir l"activité des méristèmes secondaires en l"absence de photosynthèse (Duret *et al.,* 2011).

En revanche, une sécheresse de forte intensité induit une déshydratation des tissus et empêche la remobilisation des réserves carbonées (Hartmann *et al.,* 2013). En effet, la diminution des flux d"eau dans le xylème est couplée à une perturbation des flux de sève élaborée dans le phloème, réduisant la propagation des sucres vers les organes puits (Sevanto *et al.,* 2014). Le laps de temps entre l"arrêt de photosynthèse et l"arrêt de croissance s"avère

crucial dans la survie des arbres, comme illustré chez *Pinus radiata* et *Eucalyptus globulus* (Mitchell *et al.,* 2014). Ces deux espèces utilisent des stratégies d"utilisation de l"eau et de croissance opposées : le pin est une espèce à croissance lente contrairement à l"eucalyptus en conditions hydriques non-limitantes. La croissance des deux espèces est stoppée pour un potentiel hydrique équivalent (Ψ_{md} = -1,4 MPa). En revanche, le niveau de photosynthèse est maintenu chez l"eucalyptus jusqu"à des potentiels approchant -2,4 MPa et pour le pin -1,5 MPa. La marge de sécurité pour le carbone, (dite C safety margin) qui correspond au laps de temps entre l"arrêt de croissance et de photosynthèse, est faible pour le pin et élevée pour l"eucalyptus. Par ce biais, l"eucalyptus limite la diminution de ses réserves de carbone au cours de la sécheresse (Mitchell *et al.,* 2014).

La rupture de la colonne d"eau est étroitement liée à la mort des arbres en stress hydrique, mais la marge de sécurité de carbone et l"épuisement des réserves carbonées pourraient également fortement y contribuer (McDowell *et al.,* 2008; Sala *et al.,* 2010; Sevanto *et al.,* 2014; Mitchell *et al.,* 2014). Cependant, les preuves de l"implication de la privation de carbone dans la mort de la plante sont peu nombreuses (Sala *et al.,* 2010). La déshydratation foliaire affecte le métabolisme primaire et s"accompagne de nombreuses modifications protéomiques en fonction des génotypes (Bonhomme *et al.,* 2009). Les protéines accumulées sont impliquées dans la réduction des dommages dus au stress oxydatif (celles du cycle de l"ascorbate/glutathion), dans les régulations post-traductionnelles et la photorespiration (Bonhomme *et al.,* 2009). Des acides aminés peu chargés, comme la proline, sont accumulés dans les cellules afin d"augmenter le potentiel osmotique ce qui permet de conserver l"eau dans les vacuoles et de garantir l"homéostasie cellulaire (cf. section 4.2.3).

Les modifications physiologiques observées peuvent être réversibles contrairement à la perte de taille des organes à croissance finie. La tension dans la colonne d"eau provoque cavitation et collapses dans les feuilles matures ce qui, couplé à des signaux hormonaux via les cytokinines (Hwang *et al.,* 2012) et les ROS (Jajic *et al.,* 2015), serait à l"origine d"une abscission précoce des feuilles (Milburn, 1966; Nardini *et al.,* 2001; Brodribb et Holbrook, 2003; Hukin *et al.,* 2005; Street *et al.,* 2006; Cochard *et al.,* 2007). En effet, un stress hydrique sévère peut provoquer une perte de rameaux qui a pour origine l"embolie des vaisseaux (Rood *et al.,* 2000; Davis *et al.,* 2002; Tyree *et al.,* 2002; Nardini *et al.,* 2013). La surface du couvert végétal va alors diminuer malgré la mise en place de nouvelles feuilles, ce qui constituerait une stratégie pour limiter les pertes en eau par transpiration. L"anatomie des nouvelles feuilles peut également évoluer dans le cas de stress hydrique sévère et leur impact est détaillé dans la section 3.4.

3.3. Les dysfonctionnements et dommages du système hydraulique foliaire causés par un déficit hydrique

Le dysfonctionnement hydraulique des tiges, des pétioles et des feuilles d"une plante en stress hydrique est généralement assimilé à l"embolie des vaisseaux de xylème (Nardini *et al.,* 2001; Salleo *et al.,* 2001). La vulnérabilité à la cavitation des organes végétaux serait dépendante des espèces. Les pétioles, comparés aux rameaux, sont plus fortement touchés par les pertes de débit hydrique en cas de sécheresse édaphique (Cochard *et al.,* 1992). Cependant, il a été montré chez *Populus balsamifera* que le pétiole était plus résistant à la cavitation que les rameaux et les racines (Hacke et Sauter, 1996). En revanche, la nervure principale des feuilles de *Populus trichocarpa x koreana*, *P. alba* et *P. euphratica* serait la plus vulnérable à la cavitation comparée à la tige et à la racine (Hukin *et al.,* 2005). Ce serait l"embolie des nervures majeures qui déterminerait la rupture hydraulique des feuilles (Brodribb et Holbrook, 2006; Johnson *et al.,* 2009; Brodribb *et al.,* 2016). Les travaux effectués sur plusieurs espèces d"Angiospermes indiquent que l"embolie xylémienne se déroulerait dès que le P50 est atteint après la fermeture des stomates dans le cas d"un stress sévère et rapide (Brodribb *et al.,* 2016). Cependant, l"embolie générée dans les feuilles ayant atteint au maximum le P50 peut être totalement résorbée et la fonctionnalité des vaisseaux de xylème entièrement recouvrée dès réarrosage (Brodribb et Cochard, 2009). Au-delà de cette valeur, le retour à une valeur de potentiel hydrique foliaire antérieure aux évènements d"embolie est impossible. L"anatomie du bois jouerait un rôle essentiel dans les régulations hydriques puisqu"une forte densité de bois et une grande quantité de vaisseaux de faible diamètre induisent une diminution de P50 (Plavcova et Hacke 2012).

Des collapses, correspondant à l"effondrement des vaisseaux sur eux-mêmes, peuvent survenir dans les vaisseaux du xylème sous forte tension. La vulnérabilité au collapse des nervures dépend de l"épaisseur des parois et du diamètre de la lumière des vaisseaux. Un vaisseau de xylème avec une paroi épaisse et un diamètre faible sera plus résistant au collapse qu"un vaisseau d"un diamètre plus élevé et une paroi fine. La P50 de la feuille mesurée chez différents arbres est positivement corrélée à la vulnérabilité au collapse des nervures mineures et au potentiel osmotique des cellules mésophylliennes (Blackman *et al.,* 2010). En revanche, la P50 de la feuille n"est pas corrélée à la densité de matière par unité de surface foliaire (Leaf Mass per Area ou LMA; Blackman *et al.,* 2010). L"importance du collapse a été identifié chez le conifère tropical *Podocarpus grayi*: lors d"un épisode de sécheresse, les stomates se ferment lorsque la conductance hydraulique foliaire diminue de 25% et que 45% des

trachéides sont collapsées (Brodribb et Holbrook, 2005). Il est intéressant de noter que les trachéides collapsées retrouvent leur fonctionnement hydraulique seulement une semaine après réhydratation, ce qui constituerait un avantage adaptatif dans un milieu où la disponibilité en eau est variable. Ces résultats suggèrent que le collapse, en plus de la cavitation, peut induire le dysfonctionnement du flux hydrique foliaire en cas de stress hydrique. De plus, les propriétés physico-chimiques du mésophylle semblent jouer un rôle essentiel dans la vulnérabilité hydraulique foliaire tout comme l"architecture du système nervaire. Il a été récemment montré chez quatre espèces d"Angiospermes que la part du xylème et celle du mésophylle dans la résistance totale de la feuille étaient spécifiques de l"espèce lors d"une sécheresse (Trifiló *et al.,* 2016). En effet, chez *Aleurites moluccana* et *Vitis labrusca*, la vulnérabilité hydraulique foliaire serait provoquée par la détérioration équivalente des flux xylémien et extra-xylémien. En revanche, la décroissance hydraulique foliaire chez *Quercus rubra* et *Magnolia grandiflora* est provoquée par l"altération du flux xylémien.

3.4. La régulation des flux d"eau par l"anatomie foliaire

3.4.1. La plasticité anatomique de la feuille

L"architecture nervaire, la morphologie, l"agencement et la proportion des tissus foliaires sont des paramètres très variables au sein du règne végétal (Gifford *et al.,* 1989; Kenzo *et al.,* 2004; Efroni *et al.,* 2010). Il y a 140 Millions d"années, la densité de nervures a augmenté de l"ordre de trois à quatre fois pendant la phase précoce de l"émergence des Angiospermes (Brodribb *et al.,* 2010). Les structures foliaires d"espèces non Angiospermes, comme celles des conifères, ont néanmoins perduré jusqu"à maintenant prouvant leur efficacité dans leur survie. Le réseau de régulation génétique du développement foliaire chez l"ensemble des espèces végétales actuelles serait soumis à une évolution stochastique, ce qui justifierait la multiplicité des systèmes de développement foliaire (True et Haag, 2001; Townsley et Sinha, 2012). Cependant, un sous-réseau de gènes fortement conservé maintiendrait les fonctions fondamentales de la feuille (Erwin et Davidson, 2009). L"influence de ce sous-réseau se manifeste au travers des relations allométriques, fortement conservées parmi les espèces de strates écologiques très différentes. C"est le cas par exemple de la proportionnalité de tailles des cellules de la gaine périvasculaire, du mésophylle et de l"épiderme abaxial (John *et al.,* 2013). De plus, il a été montré que plus le volume d"une cellule est important, plus l"épaisseur de la paroi augmente et plus la feuille est épaisse (John *et al.,* 2013). Enfin, la taille du génome aurait aussi un rôle à jouer dans la taille des

cellules puisque un grand génome favoriserait la formation de cellules épidermiques de grande taille (Bonner, 2006). Le pool de gènes conservé garantit le développement de feuilles fonctionnelles alors que l"ensemble des régulations génétiques spécifiques des espèces confèrerait à la feuille une importante plasticité morphologique en réponse à la fluctuation des paramètres environnementaux (Murphy *et al.,* 2012; Townsley et Sinha, 2012).

Ceci est crucial lorsque l"on considère que les feuilles des arbres ne sont pas toutes soumises aux mêmes conditions microclimatiques suivant leur position au sein du houppier. Celles positionnées à la surface de la canopée sont plus exposées à la lumière, aux variations de température et de dessèchement par le vent que celles proches du tronc. Le développement et la croissance des tissus déterminant l"anatomie foliaire, dépendent des conditions environnementales entre la mise en place du bourgeon et le développement de la feuille. Ainsi, il a été montré que chez certains arbres tropicaux et tempérés, les feuilles pouvaient ou non contenir une extension de gaine périvasculaire en fonction de leur position au sein de la canopée (Kenzo *et al.,* 2007; Lynch *et al.,* 2012). Ces modifications seraient dues au microclimat hydrique et lumineux. En revanche, l"anatomie de certains tissus foliaires préformés dans le bourgeon ne pourrait évoluer avec le milieu. En effet, la densité des nervures majeures serait fixée et non modulable au cours du développement de la feuille même en cas de modifications climatiques (Sack *et al.,* 2012). Certaines étapes de la croissance, comme l"élongation foliaire, ont dû s"adapter aux conditions climatiques, c"est pourquoi celle-ci est plus forte durant la nuit et en fin de journée lorsque la quantité de lumière et la transpiration sont faibles (Tardieu *et al.,* 2014). De plus, celle-ci s"effectue une fois que le squelette nervaire s"est entièrement développé.

3.4.2. Les ajustements anatomiques en conditions hydriques limitantes

L"anatomie de la feuille s"ajuste en réponse à une variation de quantité d"eau au travers de la proportion de ces tissus et de la morphologie foliaire. La vitesse d"élongation cellulaire et la division cellulaire sont ralenties ce qui augmente le temps de mise en place des feuilles (Cutler *et al.,* 1980; Battaglia *et al.,* 1998; Pedrol *et al.,* 2000; Marron *et al.,* 2002; Chaves *et al.,* 2003; Iogna *et al.,* 2013; Bizet *et al.,* 2014). L"élongation des jeunes feuilles est étroitement liée à la conductance stomatique, aux potentiels hydriques du xylème et du mésophylle, un faible débit d"eau provoquant une diminution d"élongation foliaire (Caldeira *et al.,* 2014). En revanche, les tissus foliaires matures possèdent un potentiel hydrique diminuant plus lentement à cause de mécanismes de rétention d"eau, appelées capacitances hydrauliques (Caldeira *et al.,* 2014). L"élongation des jeunes feuilles fixerait l"intensité de la

force « puits » de la plante lors du stress hydrique alors que la force « source » serait principalement dépendante du niveau de photosynthèse (Tardieu *et al.,* 2014). En effet, les feuilles en cours de développement de *Populus tremula x alba* et également celles de *Colliguaja integerrima* deviennent plus épaisses lors d"une carence hydrique que les feuilles se développant en condition hydrique non-limitante (Aasamaa *et al.,* 2005; Iogna *et al.,* 2013). En revanche, les feuilles de *Populus tremula* dans des conditions hydriques limitantes ne montrent pas de variation d"épaisseur mais plutôt une augmentation de densité de matière et une surface foliaire réduite (Tosens *et al.,* 2012). Scoffoni *et al.* (2011) montrent que les petites feuilles posséderaient des niveaux importants de hiérarchisation et de ramification des nervures permettant une augmentation de l"hydratation du mésophylle pour lutter contre la sécheresse. Cette morphologie diminuerait la vulnérabilité hydraulique, c"est-à-dire la valeur de potentiel hydrique foliaire induisant une perte de 50% à 80% de conductance hydraulique foliaire. De plus, la structure interne des feuilles de *Populus tremula x alba* soumises à une carence hydrique est largement modifiée avec une augmentation de surface de la nervure principale, du mésophylle et de l"épiderme abaxial sur des coupes transversales de feuilles (Aasamaa *et al.,* 2005). La quantité de chloroplastes du mésophylle par unité de surface est plus faible et les parois cellulaires plus épaisses (Aasamaa *et al.,* 2005). De façon générale, les cellules sont plus nombreuses et plus serrées les unes contre les autres. L"augmentation de l"épaisseur des parois expliquerait en partie la diminution de conductance hydraulique mésophyllienne des feuilles en sécheresse, comme c"est le cas chez des feuilles de tomates acclimatées à de faibles quantités d"eau (Galmés *et al.,* 2013). Les modifications morpho-anatomiques vont de pair avec une diminution de la conductance hydraulique foliaire, du potentiel osmotique et une perte d"assimilation carbonée chez *P. tremula x alba* en stress hydrique (Aasamaa *et al.,* 2005). Afin de restreindre les pertes d"eau, la perméabilité cuticulaire peut être réduite par un accroissement de production de cire, comme chez *Berberis microphylla* ou *Colliguaja integerrima* vivant sous contraintes de rafales de vent fortes et régulières (Iogna *et al.,* 2013).

Le stomate est la structure à l"interface plante-atmosphère à l"origine des régulations des flux gazeux. C"est pourquoi l"impact du manque en eau sur l"anatomie foliaire est classiquement évalué par la densité des stomates. *Quercus velutina*, une espèce tolérante au stress hydrique, possède une cuticule plus épaisse, une densité stomatique et une épaisseur du parenchyme palissadique plus faibles, que chez *Quercus rubra*, une espèce plus sensible au stress hydrique (Ashton et Berlyn, 1994). Cette faible quantité de stomates chez les espèces tolérantes à la sécheresse permettrait de limiter les pertes en eau par transpiration. De plus, la

mise en place des stomates peut être perturbée au cours du développement des feuilles sous contrainte hydrique. En effet, la densité de stomates diminue dans les feuilles de *Populus balsamifera* dont le développement et la croissance se sont déroulés pendant une carence hydrique (Hamanishi *et al.,* 2012). En revanche, certains arbustes de steppes de Patagonie semblent utiliser une toute autre stratégie : la quantité de stomates des feuilles exposées au vent est plus importante que celle des feuilles proches du tronc, à l"abri de fortes variations d"humidité relative (Iogna *et al.,* 2013). Cette dernière observation peut sembler paradoxale mais aurait l"intérêt d"améliorer la sensibilité des stomates aux variations de potentiels hydriques dans l"objectif d"une capture plus rapide de CO_2 une fois que les conditions environnementales sont favorables dans ce type d"environnement. Les ajustements morpho-anatomiques de ces feuilles viennent en complément des autres modifications phénotypiques et physiologiques fortes ce qui pourrait limiter l"effet des perturbations environnementales sur la physiologie de la plante (Iogna *et al.,* 2013).

3.5. Les stratégies de réponse au déficit hydrique

Les plantes répondent à un manque d"eau par la régulation de nombreux paramètres physiologiques, de croissance et de développement dans le but de maintenir le débit hydrique tout assurant la synthèse de biomasse afin d"assurer leur survie. La mise en place de ces régulations s"effectue à un degré et à une vitesse qui dépendent des génotypes et définissent la stratégie de réponse des plantes. Deux stratégies ont été définies parmi les plantes de climat tempéré malgré la diversité des réponses observées : la tolérance et l"évitement. Une plante tolérante continuera de produire de la biomasse, conservera un niveau de croissance et de développement malgré des conditions d"hydratation sub-optimales (Farooq *et al.,* 2009) et limitera la déshydratation par des ajustements osmotiques (Gebre *et al.,* 1994; Marron *et al.,* 2002; Hanin *et al.,* 2011; Barchet *et al.,* 2013). Au contraire, une plante évitante, plus sensible à la sécheresse, limitera rapidement les pertes en eau par la fermeture rapide de ses stomates, par une abscission précoce d"organes notamment des feuilles (Jackson *et al.,* 2000; Couso et Fernetez, 2012). La détermination de la stratégie de réponse d"une plante à un déficit hydrique est complexe de par la diversité de régulations des paramètres phénotypiques et de leur gamme de variation (Xu *et al.,* 2010). Il est donc plus juste de parler de degré de tolérance à la sécheresse pour qualifier la stratégie des plantes, comme c"est le cas du peuplier (Marron *et al.,* 2003; Monclus *et al.,* 2006; Silim *et al.,* 2009; Isebrets et Richardson, 2014). La gamme de variation des traits physiologiques est importante dans le genre *Populus* en réponse au

stress hydrique et l'on retrouve une spécificité de réponse en fonction du génotype étudié, en ce qui concerne la régulation du potentiel hydrique (Brignolas *et al.,* 2000; Marron *et al.,* 2002), la sensibilité des stomates aux fluctuations d'humidité (Tardieu et Simonneau 1998; Hamanishi *et al.,* 2012), la sénescence précoce, le développement foliaire (Marron *et al.,* 2002; Marron *et al.,* 2003), les traits de croissance (Giovannelli *et al.,* 2007) et les ajustements métaboliques (*e.g.* Marron *et al.,* 2006; Bonhomme *et al.,* 2009; Barchet *et al.,* 2013; Hamanishi *et al.,* 2015). De telles spécificités de régulation des traits phénotypiques ont été identifiées également parmi des génotypes de *Populus nigra* en réponse à un déficit hydrique (Lambs *et al.,* 2006; Cocozza *et al.,* 2010; Chamaillard *et al.,* 2011; Viger *et al.,* 2016). Les régulations s'observent également à l'échelle moléculaire. Certains transcrits permettent d'améliorer la tolérance au stress hydrique, comme cela a été montré pour l'arabette avec la sur-expression d'un facteur de transcription appelé *PdNF-YB7* isolé chez un clone de peuplier (*P. nigra x (P.deltoides x nigra*); Han *et al.,* 2013). McDowell *et al.* (2008) soulignent qu'une espèce considérée tolérante à un stress hydrique, selon les critères énoncés précédemment, côtoie la plupart du temps la limite de rupture hydraulique et la marge de sécurité de carbone. Ceci expose ces espèces à des risques de dommages irréversibles voire à une proportion de mortalité importante dès leur limite hydraulique atteinte. Finalement, une espèce peut être qualifiée de tolérante ou évitante dans des conditions précises d'intensité, de vitesse et de durée de sécheresse.

Parmi les nombreux paramètres impliqués dans la réponse au déficit hydrique, la régulation des stomates apparait être le plus important pour représenter les régulations de flux d'eau et du potentiel hydrique foliaire (Tardieu et Davies, 1993; Jones, 1998; Tardieu et Simonneau, 1998). Ainsi sur la base de ce paramètre, certains auteurs distinguent les espèces selon deux stratégies, isohydriques et anisohydriques (Stocker, 1956). La stratégie isohydrique correspond à la fermeture rapide des stomates en réponse au déficit hydrique, impliquant le maintien du potentiel hydrique minimum. Au contraire, les espèces anisohydriques ne diminuent que légèrement leur conductance stomatique dans les mêmes conditions environnementales pour maintenir les échanges gazeux, conserver la fixation de carbone et les flux d'eau. Dans ce cas, le niveau de potentiel hydrique foliaire minimum devient plus variable. Ces réponses ont été identifiées chez de nombreuses espèces herbacées et arborescentes (Tardieu et Simonneau 1998; Sade *et al.,* 2012) comme le peuplier. *Populus euramericana* utiliserait une stratégie isohydrique en réponse à un déficit hydrique avec une décroissance de potentiel hydrique foliaire minimum atteignant la même valeur que le potentiel hydrique foliaire de base (Tardieu et Simonneau 1998). Des réponses similaires ont

été observées chez *P. simonii x balsamifera* alors que *P. balsamifera* maintient une conductance stomatique forte et une production de biomasse pendant une sécheresse (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010). Une espèce peut être isohydrique comme la tomate puis devenir anisohydrique grâce à la sur-expression constitutive d"une aquaporine facilitant le flux d"eau au travers du tonoplaste (Sade *et al.,* 2009). Des résultats similaires ont été présentés chez l"arabette (Lin *et al.,* 2007; Peng *et al.,* 2007) démontrant que l"étude de la réponse moléculaire de plantes soumises au stress hydrique apporterait une meilleure compréhension du fonctionnement hydrique de la plante.

Il apparait nettement que les stratégies évitante et isohydrique sont interconnectées, tout comme les stratégies tolérante et anisohydrique. En effet, les stratégies tolérante/évitante intègrent les paramètres définissant les stratégies iso/anisohydriques (conductance stomatique et potentiels) et il s"avère que la plupart des espèces anisohydriques sont également tolérantes à la sécheresse (McDowell *et al.,* 2008). Un avantage à utiliser les définitions de stratégies iso/anisohydriques réside dans le fait qu"une espèce peut être qualifiée sans comparaison avec une autre, en regardant la relation entre conductance stomatique et potentiel hydrique foliaire. Le poids accordé à la conductance stomatique dans la réponse des arbres à une sécheresse est donc très fort. Or, un ensemble de processus physiologiques et architecturaux complexes s"ajoutent à la régulation de l"ostiole stomatique, qui pourrait ne pas s"avérer l"élément fondamental de la stratégie de réponses des arbres. Une étude intégrative est donc capitale pour appréhender la complexité des réponses écophysiologiques des arbres.

4. Les régulations moléculaires en réponse au déficit hydrique

4.1. L"étude du transcriptome par RNAseq

4.1.1. Le principe du RNAseq

La résolution, la précision et l"accessibilité des Next Generation Sequencing (NGS) n"ont cessé d"évoluer jusqu"au développement d"une méthode de quantification de l"expression des gènes à haute résolution, le RNA-sequencing (RNAseq) (Weber *et al.,* 2007). Cette technique donne l"opportunité d"étudier avec précision le transcriptome d"un échantillon au travers de sa structure et de sa dynamique (Wang *et al.,* 2009). Le séquençage par RNAseq repose sur une technique NGS, actuellement Illumina, qui peut s"effectuer dans un seul sens (single-end) ou dans les deux sens de la séquence (pair-end). Le séquençage en single end peut être intéressant pour des petits transcriptomes peu complexes. La seconde option garantit

un meilleur positionnement des fragments de transcrits lors de l"assemblage et de la comparaison au transcriptome de référence, qui peut ne pas être exactement identique au transcriptome étudié. Deux caractéristiques essentielles de la méthode doivent être fixées avant séquençage : la couverture et la profondeur de séquençage (Fang et Cui, 2011). La couverture de séquençage correspond à la quantité de transcrits interrogés. La couverture doit permettre un recouvrement d"environ 30X la taille du transcriptome étudié pour pouvoir générer un résultat statistiquement exploitable. Une meilleure couverture requiert une profondeur de séquençage plus importante. La profondeur de séquençage correspond à la quantité de fragments d"ARN séquencés par transcrits. Plus la structure d"un génome est complexe, c"est-à-dire possède de duplications, d"isoformes de gènes, de moyens de régulations ou de polymorphisme, plus cette profondeur doit être importante. Une fois ces paramètres déterminés, la technique est appliquée sur l"ARN total extrait de l"échantillon étudié. Il est ensuite fragmenté par hydrolyse ou par nébulisation (cassure par ultrason) en séquences d"environ 100 pb puis réverse complémenté en ADNc. Cet ADNc est ligué à des adaptateurs spécifiques et isolé dans un plasmide. Une étape d"amplification par PCR peut être incluse à la procédure mais ceci est le plus souvent évité pour limiter les erreurs de réplication (Wang *et al.,* 2009). Les librairies générées sont fixées sur une lame grâce aux adaptateurs. Une lame possède environ 8 canaux, chaque canal correspondant à un échantillon précis. Il est possible de multiplexer les échantillons sur une lame, c"est-à-dire d"augmenter le nombre d"échantillons, tout en sachant que la profondeur de séquençage sera réduite. Le séquenceur de nouvelle génération Illumina se charge de synthétiser le brin complémentaire de chaque ADNc. Après une première dénaturation, un pont se crée entre séquences d"adaptateurs puis il y a synthèse du brin complémentaire et dénaturation, etc. A chacun des quinze cycles, un nucléotide va être incorporé à la nouvelle séquence et la fluorescence spécifique de la base azotée va être détectée par une caméra. La séquence de chaque fragment est stockée pour être analysée.

4.1.2. L"analyse des données RNAseq

Les données de séquençage sont nettoyées afin d"éliminer les séquences artefactuelles (fragments de plasmides, amorces), les séquences de faible complexité, de petites tailles, les poly-A et celles contenant des nucléotides anonymes. Seules les séquences appartenant au transcriptome étudié sont conservées et celles qui possèdent une paire sont conservées. Les séquences sont ensuite alignées afin d"identifier les transcrits de l"espèce étudiée. Cet assemblage peut s"effectuer sur la base d"un transcriptome de référence ou *de novo*. L"étape

de correspondance, dite mapping, est réalisée à partir d"un transcriptome de référence si l"espèce étudiée possède un génome grand et complexe. L"assemblage et le mapping permettent d"effectuer un comptage du nombre de fois où la séquence des transcrits a été trouvée. Les comptages, suivant une loi binomiale négative, sont normalisés par la taille des transcrits et sont transformés pour identifier leur niveau d"expression dans l"échantillon étudié. Le niveau d"expression d"un échantillon est généralement comparé à celui d"un échantillon contrôle afin de calculer un niveau d"expression différentiel en base 2, dit Log 2 Fold Change. Un niveau d"expression différentiel et significatif d"un transcrit dans une condition par rapport à une autre définit les gènes différentiellement exprimés ou Differentially Expressed Genes (DEG). Les techniques de séquençage NGS, comme le RNAseq, permettent d"accéder à des niveaux de compréhension du fonctionnement cellulaire et moléculaire des plantes en associant des transcrits à une fonction putative identifiée chez d"autres espèces végétales (Martin *et al.,* 2013). Il s"agit de l"ontologie de gènes (Gene Ontology, GO) qui donne une idée de la fonction biologique (Biological Process), de la localisation cellulaire (Cellular Component) et de l"activité moléculaire (Molecular Function) des transcrits d"intérêt (Ashburner *et al.,* 2000). Une fois ces associations fonctionnelles effectuées, les grandes fonctions biologiques particulièrement modifiées peuvent être identifiées en comparant la fréquence d"apparition des DEG avec leur fréquence dans le transcriptome de référence. Les résultats d"association fonctionnelle doivent être pris avec précautions car ils dérivent d"une analyse d"homologie de séquences issues de nombreuses espèces du règne végétal qui, malgrè tout, possèdent un système de régulation et une épistasie (caractérisant les interactions entre gènes) qui leur est propre (Townsley et Sinha, 2012). De plus, les phénomènes de duplication des gènes, nombreux chez *Populus trichocarpa*, offrent de nouvelles opportunités de régulations génétiques aux travers des facteurs de transcriptions (Flagel et Wendel, 2009).

4.1.3. Le génome de référence

Peu d"informations sont disponibles concernant les données génétiques de *Populus nigra*, même si certaines avancées ont permis d"identifier des Single Nucleotide Polymorphism (SNP) parmi 51 génotypes de peupliers noirs (Faivre-Rampant *et al.,* 2016). C"est pourquoi, il est nécessaire d"utiliser un génome de référence, celui de *P. trichocarpa*, qui fait partie des espèces modèles séquencées (Bradshaw *et al.,* 2000; Taylor, 2002) pour les raisons économiques et scientifiques qu"on lui connait. Il possède un génome diploïde de 485 Mpb, 45 555 gènes nucléaires répartis dans 19 chromosomes, 153 gènes plastidiques et

73 013 transcrits identifiés dans la version 3 de l"annotation. La structure du génome a été étudiée en détail et a permis notamment de mettre en évidence deux évènements de duplication (Tuskan *et al.,* 2006). Le premier est mis en évidence par l"existence de 8 000 paires de gènes paralogues et le second évènement date de la divergence entre le peuplier et l"arabette, il y a entre 100 et 120 millions d"années, il a permis des réarrangements chromosomiques, des duplications en tandem et des substitutions. Le niveau d"hétérozygotie est fort et plus de 1,2 millions de SNP ont été positionnés sur une carte génétique. La variabilité génétique est donc très forte pour cette espèce (Tuskan *et al.,* 2006). Des évènements d"insertions et délétions, concernant respectivement 10 586 et 7 889 gènes, ont été identifiés en association avec des éléments transposables chez *P. trichocarpa*, *P. nigra* et *P. deltoides* (Pinosio *et al.,* 2016). De plus, les gènes touchés par une variation du nombre de copies (Copy Number Variation, CNV) sont relatifs à des fonctions de résistance aux stress et aux pathogènes, influençant leur niveau d"expression (Pinosio *et al.,* 2016).

4.1.4. Les particularités du RNAseq

Les résultats de comptages des transcrits sont fiables et répétables grâce à la robustesse de la technique de séquençage et des analyses statistiques (Marioni *et al.,* 2008). Le RNAseq présente l"avantage de l"absence d"amplification par PCR qui peut être source d"erreurs; l"utilisation d"une faible quantité de matériel biologique permettant le séquençage, l"absence de limite supérieure de détection de la quantité de transcrits (pas de saturation du signal) et un faible bruit de fond. Les résultats de comptage de transcrits peuvent être associés à ceux de qRT-PCR (Fang et Cui, 2011). Enfin, le RNAseq permet de répondre à la fois aux questions de niveau d"expression de gènes mais met aussi en évidence les isoformes de gènes, les Single Nucleotide Polymorphism, l"hétérogénéité des structures de transcrits et la diversité d"épissage (Martin *et al.,* 2013).

Le RNAseq est une technique récente qui possède des limites identifiées. Par exemple, lors de la formation des librairies la couverture du transcrit n"est pas aléatoire et dépend notamment de la composition en GC de la séquence. De plus, Oshlack et Wakefield (2009) ont montré que plus le transcrit est long et plus la quantité de fragments associés est importante contrairement aux transcrits courts. Il est donc impératif d"effectuer une analyse statistique qui prenne en compte ce biais. Cette technique empêche la détection des transcrits très courts ou présents en faible quantité. Enfin, la quantité importante de données générée doit être stockée et bien sûr analysée par des méthodes toujours perfectibles (Wang *et al.,* 2009).

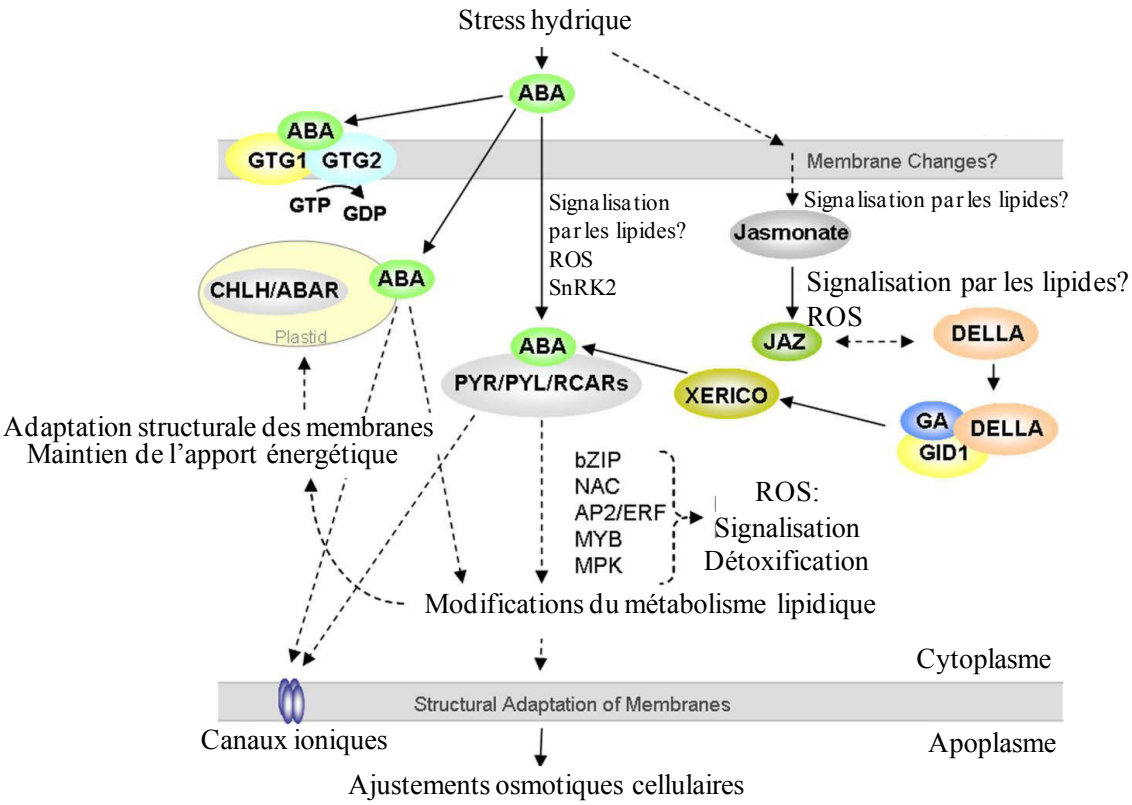


Figure 9. Interconnection des voies hormonales chez les plantes répondant au stress hydrique. La voie de modification des fonctions cellulaires dépendante de l'acide abscissique (ABA) serait interconnectée à une voie de signalisation de l'acide jasmonique. Les facteurs de transcription XERICO favoriseraient la synthèse d'ABA. Les molécules sensibles à l'ABA permettent des modifications du métabolisme lipidique, la signalisation par les lipides et les ROS ainsi que les détoxification des ROS et des ajustements osmotiques. Illustration adaptée de Golldack *et al.* (2014).

4.2. Les principales voies de réponses moléculaires au stress hydrique

Les études du niveau d"expression des gènes et de l"abondance des protéines dans les organes végétaux ont mis en évidence l"émergence de fonctions récurrentes spécifiquement modulées en réponses aux stress hydriques. En effet, la stabilisation des macromolécules, le maintien de l"homéostasie cellulaire et la détoxication sont soutenus par l"activation des facteurs de transcription (Chaves *et al.,* 2003; Wang *et al.,* 2003; Shinozaki *et al.,* 2003a; Golldack *et al.,* 2014). Une grande partie de ces modifications seraient principalement sous l"influence de l"acide abscissique (ABA).

4.2.1. Le rôle de l"acide abscissique

La sécheresse induit une synthèse rapide d"ABA chez l"ensemble des espèces de strates herbacées (Bray, 1997; Harb *et al.,* 2010; Wilkins *et al.,* 2010) à arborescente (Hoffman, 1999; Caruso *et al.,* 2002). L"ABA serait responsable des modifications de biosynthèse du glucose, du saccharose, des acides aminés, de la proline et des polyamines lors d"un stress hydrique (Urano *et al.,* 2009). Les modifications seraient induites par l"ABA uniquement à court terme et les effets seraient dépendants de l"organe considéré (Rattanakon *et al.,* 2016). L"accumulation de cette hormone permettrait de réguler l"expression d"une série de gènes de manière indirecte ou directe, grâce à son interaction avec certaines protéines et des facteurs de transcriptions dans trois voies distinctes (Seki *et al.,* 2002; Figure 9).

La première voie passe par des récepteurs membranaires de type PYR/PYL/RCAR-PP2C, suspectés d"être les premiers récepteurs du signal de sécheresse (Melcher *et al.,* 2009; Miyazono *et al.,* 2009), qui seraient sensibles aux variations de concentration en ABA (Cutler *et al.,* 2010). La chaîne de transduction du signal comprend des protéines kinases, dont l"une des premières, SNF1-related protein kinase (SnRK2), serait sous le contrôle de l"ABA et permettrait rapidement de moduler l"expression de facteurs de transcription (Yoshida *et al.,* 2002). Les facteurs de transcription des familles MYB et MYC sont connus pour être induits par l"ABA durant les phases précoces de réponses au stress hydrique (Abe *et al.,* 1997; Abe *et al.,* 2003), ainsi que les gènes codant des facteurs de transcription bZIP possédant un élément cis ABA-responsive element (ABRE) dans leur région promotrice (Hobo *et al.,* 1999; Uno *et al.,* 2000; Kang *et al.,* 2002). Les phénotypes de plantes mutantes hypersensibles à l"ABA sur-exprimant un facteur codant les protéines fixant des éléments ABRE (dites ABRE-binding proteins ou AREB/ABF) montrent une amélioration de la tolérance à la sécheresse (Kang *et al.,* 2002). Les facteurs de transcription de type NAC sont communément et différentiellement

exprimés en réponse à des stress biotiques ou abiotiques, comme le stress hydrique (Nuruzzaman *et al.,* 2013). L"ensemble des fonctionnalités des membres de la grande famille des NAC n"est pas totalement identifié et il apparait que certains facteurs de transcription NAC soit sous le contrôle de l"ABA (Tran *et al.,* 2004; Sperotto *et al.,* 2009) alors que d"autres seraient insensibles aux variations de concentration de cette hormone (Lu *et al.,* 2012; You *et al.,* 2013). L"ABA interviendrait dans une seconde voie de transduction de signal grâce à des récepteurs de type protéines G (G protein-coupled receptor-type G ou GTG) qui fixeraient l"ABA au niveau de la membrane plasmique (Petey *et al.,* 2009). La troisième voie de perception de cette hormone passerait par la fixation de l"ABA sur une magnésium chélatase (H subunit of Mg-chelatase ou CHLH/ABAR) au niveau des chloroplastes (Shen *et al.,* 2006; Du *et al.,* 2012). Les régulations qui découleraient de ces deux dernières voies ABA-dépendantes n"ont pas encore été clairement identifiées (Golldack *et al.,* 2014).

En revanche, d"autres facteurs de transcription sont sur-exprimés en cas de carence hydrique sans pour autant être dépendant de l"ABA (Shinozaki *et al.,* 2003). Par exemple les gènes possédant un élément *cis* dehydration responsive element/C-repeat (DRE/CRT) sont classiquement induits en réponse à un stress abiotique (Liu *et al.,* 1998). La sécheresse provoque également l"activation de facteurs de transcription de type DRE-binding proteins (DREB) et C-repeat-binding factor (CBF) sans concours de l"ABA (Haake, 2002). De plus, certains gènes ne sont pas sensibles aux variations de concentration en ABA, comme c"est le cas des gènes Early response to dehydration1 (ERD1) codant des protéases particulièrement actives durant la sénescence (Nakashima *et al.,* 1997). Ces résultats indiquent clairement que deux voies permettraient la régulation des gènes en réponse à un stress hydrique : la voie dépendante et la voie indépendante de l"ABA. Cependant, les deux voies seraient interconnectées (Tuteja, 2007) puisque l"accumulation de proline lors d"un stress hydrique active des gènes dépendants et indépendants de l"ABA (Mahajan et Tuteja, 2005). Des facteurs de transcription, comme RD29, ont été identifiés comme étant régulés par des gènes faisant partie des deux voies de réponse à l"ABA (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1993). La multiplicité des rôles de l"ABA complexifie le schéma de régulations des fonctions cellulaires qui semblent interconnectés.

4.2.2. Les rôles des facteurs de transcription

La cascade de signalisation et de régulation des gènes durant un stress hydrique passe par l"activation de facteurs de transcription, qui sont dépendants ou non de l"accumulation

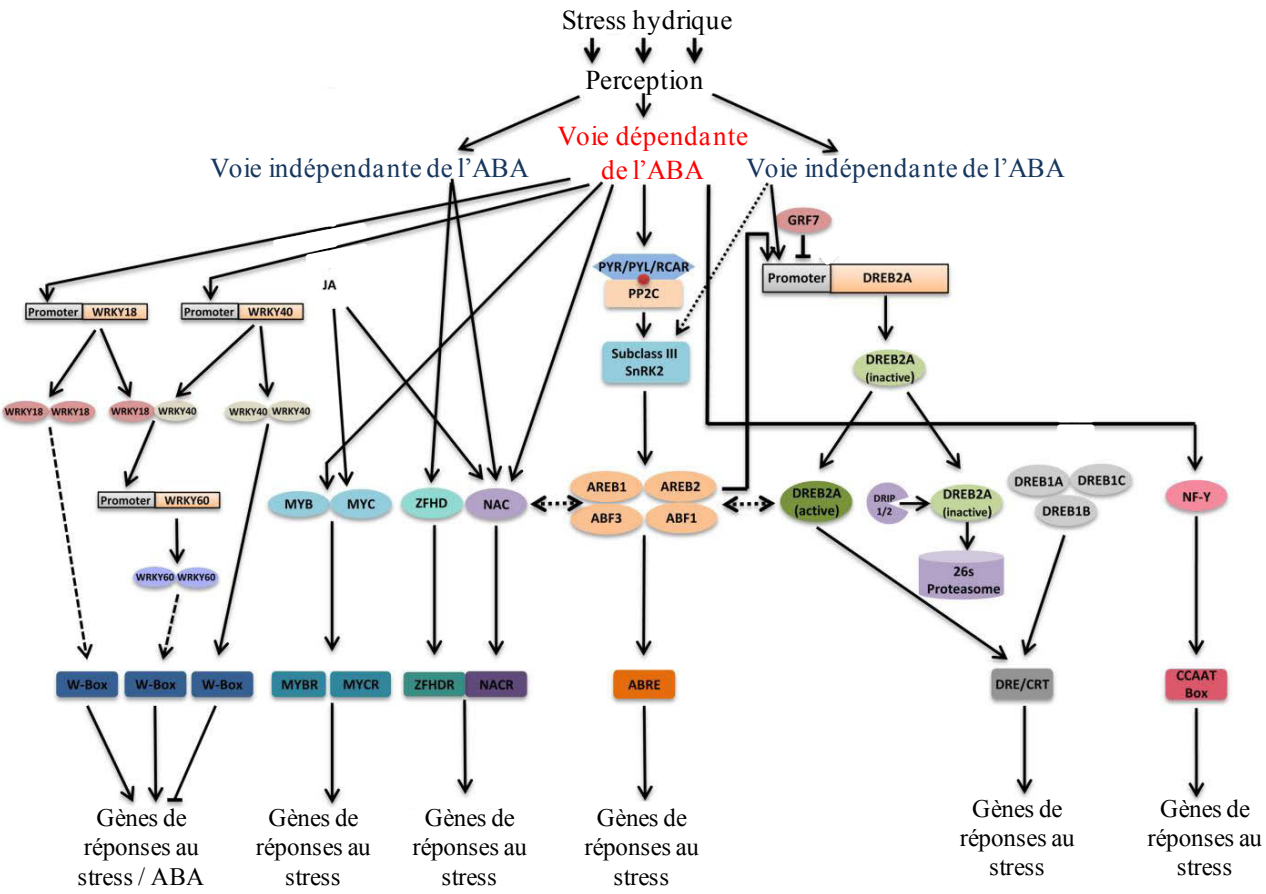


Figure 10. Régulations transcriptionnelles par les familles de facteurs de transcription intervenant dans les voies dépendantes et non-dépendantes de l'acide abscissique (ABA). Les voies dépendantes et indépendantes de l'ABA sont interconnectées et permettent la régulation de gènes de réponses spécifiques. Illustration adaptée de Singh et Laxmii (2015).

d"ABA. L"état de la connaissance actuelle indique que les facteurs de transcription DREB/CBF et ERD1 feraient partie de la voie indépendante de l"ABA alors que, comme expliqué dans la section 4.2.1., les NAC, MYC, MYB ou bZIP seraient sensibles à une modification de concentration en ABA (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006; Katiyar *et al.,* 2012; Singh et Laxmi, 2015). Le nombre important des isoformes appartenant aux différentes familles de facteurs de transcription multiplie les fonctionnalités de chaque famille dans la réponse aux stress (Golldack *et al.,* 2014; Singh et Laxmi, 2015).

Il est d"autant plus complexe d"associer une fonction à un facteur de transcription que les facteurs de différentes familles peuvent interagir entre eux (Figure 10). En effet, des preuves ont été apportées de l"interaction entre des facteurs AREB/ABF (une sous-famille des bZIP) et NAC (Nakashima *et al.,* 2012; Jensen *et al.,* 2013). De plus, la coopération de facteurs MYB et MYC serait indispensable à l"activation d"expression de gènes améliorant la sensibilité à l"ABA (Abe *et al.,* 1997). Enfin, les facteurs bZIP interagiraient avec des DREB/CBF (Lee *et al.,* 2010). C"est pourquoi, il n"est pas dans l"objectif d"être exhaustif dans la description des fonctions de régulations de chaque facteur de transcription mais plutôt de donner une appréciation de leur potentiel dans l"ajustement des réponses cellulaires à la sécheresse. Une surexpression des facteurs de transcription induit généralement une augmentation de tolérance à la sécheresse que ce soit pour les DRET/CBF (Haake, 2002) ou les NAC (Tran *et al.,* 2006).

Il est proposé que le réseau d"activation de transcription passant par les facteurs NAC, MYB, MYC et bZIP permettrait une modification structurale massive des membranes (Seki *et al.,* 2002; Guo *et al.,* 2013). Le développement de certains tissus dépendrait de l"expression de NAC, comme c"est le cas des NAC VNI2 qui interviendraient dans la répression de la formation de vaisseaux de xylème et dans l"induction de la sénescence foliaire (Yang *et al.,* 2011). De plus, une sous-famille NAC de type WRKY améliorerait la sensibilité à l"ABA, la régulation des stomates (Ren *et al.,* 2010) et la détoxication de la cellule par élimination des ROS (Jiang et Deyholos, 2009; Zheng *et al.,* 2013). Il a été également mis en évidence que la surexpression d"un facteur de transcription MYB41 stimulait le métabolisme des lipides, la synthèse des hydrates de carbone, l"expansion de la paroi cellulaire et la déposition de cire sur la cuticule (Cominelli *et al.,* 2008). Ces modifications permettent de renforcer la structure cellulaire, d"augmenter le potentiel osmotique des cellules et de limiter les pertes en eau pour tolérer la sécheresse (Cominelli *et al.,* 2008). Des AREB/ABF (AREB1, AREB2, ABF3, ABF1) augmenteraient la sensibilité à l"ABA et favoriseraient la synthèse de protéines protégeant la structure de molécules, les Late Embryogenesis Adundant (LEA) (Yoshida *et*

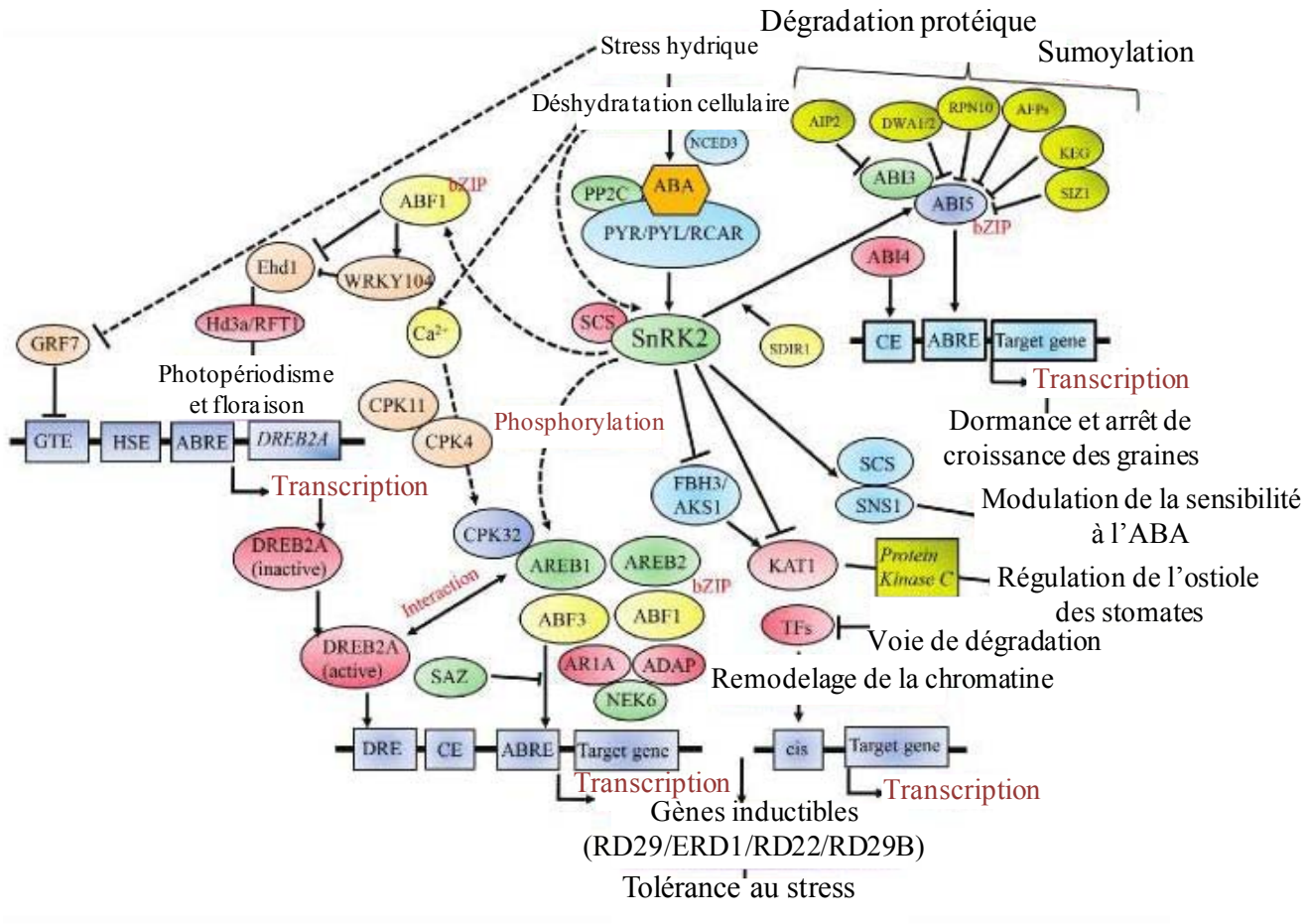


Figure 11. Modèle des régulations transcriptionnelles induites par les facteurs de transcription dépendants de l'ABA chez les plantes répondant à un stress hydrique. Les modifications des fonctions cellulaires conséquentes à la régulation par les facteurs de transcription sont indiquées en noir. Illustration adaptée de Joshi *et al.* (2016).

al., 2015; Figure 11). De manière générale, l"activation des facteurs de transcription de l"ensemble des familles mène à trois grands types de voies de réponse à la sécheresse : la stabilisation des macromolécules, la détoxication des espèces réactives de l"oxygène et de l"azote, et l"homéostasie cellulaire.

4.2.3. Les régulations osmotiques et la stabilisation des macromolécules

La perception du signal environnemental indiquant une sécheresse génère une modification du fonctionnement cellulaire permettant la transduction du signal et la mise en place de réponses complexes, qui préserveraient l"hydratation et l"intégrité cellulaire. Durant la phase de transition entre la réception du signal jusqu"aux modifications métaboliques, des déséquilibres redox sont observés ainsi qu"une perte en énergie cellulaire. L"un des premiers messagers secondaires, après le calcium, est l"accumulation de ROS (Laloi *et al.,* 2004; Miller *et al.,* 2008; Jajic *et al.,* 2015). Ces molécules, sous forme de peroxyde d"hydrogène (H_2O_2), de radicaux hydroxyles (OH^-) ou de superoxyde (O_2^-), sont des sous-produits des métabolismes aérobies qui s"accumulent en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Møller et Sweetlove, 2010). Il y a une dualité dans le rôle de ces molécules puisque leur induction fait partie d"un système de transduction du signal de stress mais que leur accumulation provoque des dommages cellulaires (Huang *et al.,* 2012). En effet, la synthèse des ROS stimulée par l"ABA est une des réponses précoces à un stress hydrique qui favoriserait la fermeture des stomates (Murata *et al.,* 2001; Yan *et al.,* 2007). Cependant, les récepteurs des ROS n"ont pas encore été identifiés et plusieurs hypothèses suggèrent que les évènements de signalisation découlant des ROS pourraient être perçus par des facteurs de transcription sensibles à l"état redox cellulaire comme les Heat Shock transcription Factor (HSF) ou passeraient par l"inhibition d"enzymes telles que les phosphatases (Miller *et al.,* 2008). En aval de la signalisation des ROS, l"activation des calmodulines, protéines fixant le calcium (Bowler et Fluhr, 2000; Knight et Knight, 2001), est favorisée ainsi que celle de protéines G (Baxter-Burrell *et al.,* 2002) et la signalisation par les phospholipides (Anthony *et al.,* 2004). De plus, les ROS interviendraient dans la cascade de phosphorylation/déphosphorylation des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ce qui activerait des facteurs de transcription de type Nucleotide Diphosphate Kinase 2 (NDPK2) pour la synthèse de molécules anti-oxydantes (Moon *et al.,* 2003; Laloi *et al.,* 2004). Enfin, les ROS seraient liées à l"abscission précoce des feuilles lors d"un stress hydrique sévère (Lee *et al.,* 2012; Jajic *et al.,* 2015). Malgré le rôle indubitable des ROS dans la transduction du

signal de sécheresse, une accumulation importante de ces molécules provoque un stress oxydatif qui peut induire des dommages menaçant l'intégrité des membranes cellulaires et la stabilité des macromolécules.

Des facteurs de transcription WRKY sont activés pour limiter les effets de ce stress (Jiang et Deyholos, 2009; Zheng *et al.,* 2013) en générant la synthèse de molécules anti-oxydatives et des protéines chaperonnes comme les LEA (Davletova, 2005; Miller *et al.,* 2008; Gao et Lan, 2016). En effet, les déhydrines, protéines chaperonnes de la classe des LEA, sont connues pour stabiliser les vésicules (Koag *et al.,* 2003), la structure de complexes enzymatiques et des membranes chez la plupart des espèces en stress hydrique (Allagulova *et al.,* 2003; Hanin *et al.,* 2011), comme chez le peuplier (Pelah *et al.,* 1997; Caruso *et al.,* 2002; Bae *et al.,* 2009).

En complément de la stabilisation de la configuration et de la fonctionnalité des molécules, la turgescence cellulaire est garantie au travers de l'accumulation de solutés qui vont accroître le potentiel osmotique de la cellule (Evans *et al.,* 1992; Bray, 1997). Les molécules d'eau vont alors être « séquestrées » par osmose dans ces compartiments osmotiques. Les ajustements osmotiques sont des processus qui se mettent en place uniquement lorsque l'intensité du stress est forte (Serraj et Sinclair, 2002). L'osmoprotection est garantie par l'accumulation de protéines et d'acides aminés peu chargés comme la proline, l'aspartate et le glutamate (Samuel *et al.,* 2000; Szabados et Savouré, 2010; Singh *et al.,* 2013), de composés méthylés tels que la glycine bétaïne (Rathinasabapathi *et al.,* 2001; Hussain *et al.,* 2008), de sucres tels que les fructanes ou le saccharose (Vijn et Smeekens, 1999; Regier *et al.,* 2009) et des cyclitoles comme le mannitol (Eterson et Kohorn, 2001). L'accumulation de proline préviendrait la dénaturation des protéines et préserverait la structure et l'activité des enzymes (Samuel *et al.,* 2000; Verslues et Sharma 2010). La glycine bétaïne stabiliserait la conformation de la RubisCO et empêcherait la dénaturation des complexes protéiques, comme le Photosystème II (Papageorgiou et Murata, 1995). Avec l'arrêt de photosynthèse, la source de carbone vient des réserves d'amidon qui sont dégradées pour former des sucres solubles (Chaves *et al.,* 2008; Meyer *et al.,* 2014). Ces molécules augmentent le potentiel osmotique cellulaire mais font aussi partie d'une voie de signalisation (Rosa *et al.,* 2009) pouvant moduler le niveau d'expression de facteurs de transcription bZIP (Rook *et al.,* 1998). Ces sucres joueraient un rôle essentiel dans le maintien des flux de sève brute et élaborée (Chaves *et al.,* 2003), grâce à la création d'une différence de potentiels entre les organes source et puits (Gamalei, 1989). L'augmentation de carbohydrates au niveau du phloème maintient un potentiel osmotique fort au niveau des organes source, ce qui permet le

transit par osmose des molécules d‟eau du xylème vers le phloème et ce tout le long de la colonne d‟eau (Sevanto *et al.,* 2014; Pfautsch *et al.,* 2015).

La survie des organes végétaux face à la sécheresse dépend aussi de la voie de signalisation des sphingolipides (Ng et Hetherington 2001). Les membranes constituent une structure de défense essentielle lors d‟une sécheresse mais ont tendance à être déformées lors de la plasmolyse. La voie de signalisation des lipides devient donc cruciale dans la survie cellulaire. Les glucosylcéramides sont les plus décrits des sphingolipides puisqu‟ils constituent en grande partie la membrane plasmique et le tonoplaste. Ces molécules sont présentes dans la monocouche apoplastique de la bicouche lipidique du plasmalemme et sont donc en contact avec le milieu extracellulaire (Pata *et al.,* 2010). Les glucosylcéramides stabilisent la membrane plasmique et sont connus pour améliorer la tolérance aux modifications de température et à la sécheresse (Quartacci *et al.,* 2001; Warnecke et Heinz, 2003). Les cérébrosides stabilisent les membranes lorsqu‟il y a une déshydratation cellulaire en (i) impactant la fluidité des monocouches lipidiques par la formation de ponts hydrogènes latéraux en intra- et inter- moléculaires et (ii) en diminuant la courbure intrinsèque de la bicouche lipidique grâce à une réduction de l‟espace entre ces deux couches dans tout le système endomembranaire (Pata *et al.,* 2010). Ceci induit une augmentation de réarrangement des lipides ce qui, en contrepartie, augmente le risque de recombinaison et la formation de la phase fatale Hexagonale II (restructuration de la membrane en micelle inversée), qui à terme peut devenir délétère (Jouhet, 2013).

4.3. La régulation des flux d‟eau par les aquaporines

4.3.1. Les particularités structurales des aquaporines

Les aquaporines font référence à la famille des Major Intrinsic Proteins (MIP), des canaux protéiques transmembranaires permettant le transit de petites molécules non chargées au travers des membranes cellulaires (Preston *et al.,* 1992; Maurel *et al.,* 1993; Chaumont *et al.,* 2000). Cinq sous-familles majeures ont été identifiées au sein des MIP avec une particularité de localisation cellulaire (Maurel *et al.,* 2008). Les deux sous-familles les plus représentées sont les Plasma membrane Intrinsic Proteins (PIP) et les Tonoplast Intrinsic Proteins (TIP), qui sont majoritairement présentes au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste. Les Nodulin 26-like Intrinsic Proteins (NIP) et les Small basic Intrinsic Proteins (SIP) sont fréquemment insérées au niveau du réticulum endoplasmique. La cinquième classe contient des aquaporines inconnues, les X Intrinsic Proteins (XIP; Danielson et Johanson, 2008; Lopez *et al.,* 2012) a été identifiée dans le plasmalemme. Les PIP ont été le plus

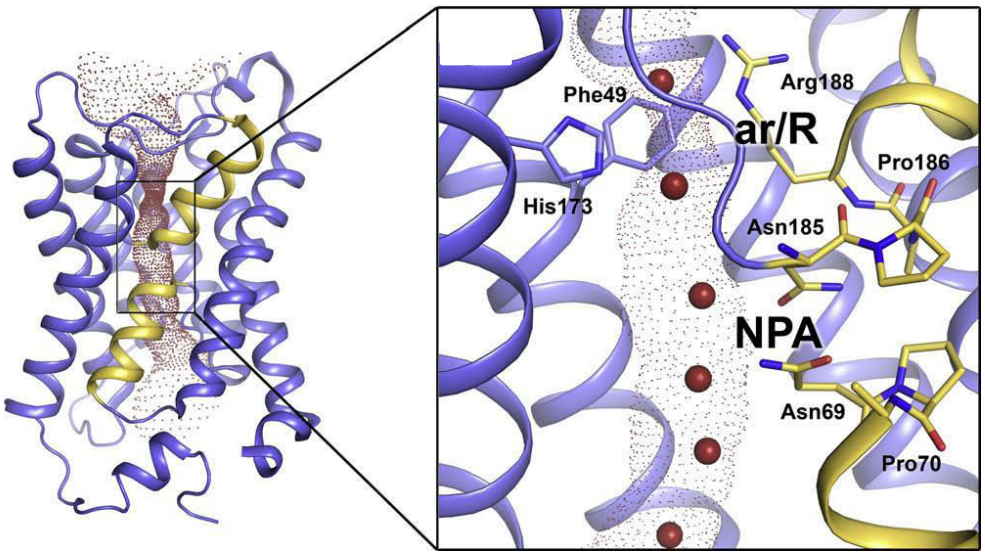


Figure 12. Structure tridimensionnelle d'un monomère aquaporine sélectif permettant le passage de molécules d'eau (en rouge). Le repliement de la séquence d'acides aminés permet la formation d'un canal central sélectif sur la base du motif Ar/R (acides aminés aromatique/Arginine). Le motif NPA (Asparagine, Proline, Alanine) empêche la formation de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau. Illustration tirée de Törnroth-Horsefield *et al.* (2010).

étudiées suite à leur caractérisation dans les cellules de *Xenopus laevis* (Preston *et al.,* 1992; Maurel *et al.,* 1993) puis chez les espèces végétales modèles (François Chaumont *et al.,* 2000). La structure polypeptidique des aquaporines est ancrée dans la membrane par six domaines de liaison transmembranaire reliés par cinq boucles intra et extra-cellulaires (Maurel *et al.,* 2008). Les fragments transmembranaires sont hydrophobes alors que les extrémités N- et C-terminales émergent dans le cytosol. Le repliement du polypeptide permet la formation d"un canal central sélectif notamment en raison de la présence de séquences d"acides aminés aromatiques conservées : le motif Ar/R (Acide aminé aromatiques/Arginine) filtre les molécules selon leur taille et le motif récurrent NPA (Asparagine, Proline, Alanine) empêche la formation de liaisons hydrogènes entre molécules d"eau (Figure 12). Ces séquences permettent d"ajuster l"ouverture du canal et de filtrer l"entrée et la sortie des molécules.

La structure des aquaporines est restée très conservée au cours de l"évolution, résultat d"évènements de duplication massifs (Cohen *et al.,* 2013; Abascal *et al.,* 2014). Leur évolution récente et rapide a permis l"émergence d"une grande diversité d"isoformes (Soto *et al.,* 2012). Dans le cas de la famille la plus étudiée, deux isoformes PIP1 et PIP2 ont été caractérisées par la divergence de leur structure tridimensionnelle : l"extrémité N-terminale est plus longue que l"extrémité C-terminale chez les PIP1, alors que l"inverse est observé chez les PIP2 (Fotiadis *et al.,* 2000).

4.3.2. Les fonctions des aquaporines

Les aquaporines en général, et les PIP en particulier, ont été principalement étudiées pour leur rôle dans la régulation des flux d"eau et de petites molécules non chargées. L"agencement des aquaporines en hétéro- ou homo-tétramère est essentiel pour faciliter le transport de molécules au sein de chaque aquaporine. Les molécules transportées au travers du canal sélectif des aquaporines sont de faible poids moléculaire, et aussi diverses qu"il existe d"isoformes différentes comme les molécules d"eau, le glycérol, l"urée, le formamide, l"acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, ou des gaz tel que le CO_2 (Soto *et al.,* 2012; Perez Di Giorgio *et al.,* 2014; Chaumont et Tyerman, 2014; Maurel *et al.,* 2016). La régulation de la conductance hydraulique foliaire est associée à l"activité des PIP2 et des TIP1 qui séquestreraient des molécules d"eau au sein de la vacuole et du cytosol (Cochard *et al.,* 2006; Hachez *et al.,* 2008; Lopez *et al.,* 2013). Les isoformes peuvent être exprimées spécifiquement dans les organes : ainsi, les PIP2 ;2, PIP2 ;5 et PIP2 ;7 favoriseraient la régulation de la transpiration foliaire de *Populus simonii x balsamifera (*Almeida-Rodriguez *et*

al., 2010). Les PIP2 ;2 racinaires faciliteraient le transport des petites molécules dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* (Javot *et al.,* 2003), alors que les isoformes PIP2 ;1 et PIP2 ;5 assureraient le transport facilité d'eau au travers des cellules entourant la bande de Caspary des racines de Maïs (Hachez *et al.,* 2006). Il a été montré que les aquaporines de type PIP2 des feuilles transportent du peroxyde d'hydrogène (Bienert et Chaumont, 2014) et du CO_2 (Zhao *et al.,* 2016). Certaines PIP1 sont aussi capables de favoriser le transit du CO_2 dans les feuilles (Otto *et al.,* 2010; Secchi et Zwieniecki, 2013; Kaldenhoff *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2016).

L'activité de ces aquaporines est généralement associée à la régulation de la perméabilité à l'eau du plasmalemme mesurée à l'aide d'un gradient osmotique (Gaspar, 2003; Sade *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2016). En effet, une réduction drastique de la quantité de canaux PIP1 par silencing des gènes chez *Arabidopsis* diminuent la perméabilité osmotique dans les cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire, la conductance du mésophylle au CO_2, la photosynthèse, la conductance hydraulique foliaire, la transpiration et la biomasse caulinaire (Sade *et al.,* 2014).

4.3.3. Les régulations de l'activité des canaux

Plusieurs ajustements biochimiques sont nécessaires à l'activation des canaux et au transit des petites molécules. En effet, l'ouverture/fermeture du canal central est régulé par la phosphorylation de plusieurs résidus sérine au niveau de boucles sensibles aux variations de pH (par exemple, la Ser115 de la boucle B), la concentration de cations bivalents cytosoliques, comme le Ca^{2+}, la protonation, la méthylation ou la formation de pont disulfide sont autant de modifications post-traductionnelles qui peuvent activer/désactiver la fonctionnalité des aquaporines (Johansson *et al.,* 1998; Prak *et al.,* 2008; Santoni *et al.,* 2006; Törnroth-Horsefield *et al.,* 2010; di Pietro *et al.,* 2013). De plus, il est apparu que la sélectivité des pores est dépendante de l'identité des isoformes composant le tétramère (Fetter, 2004; Yaneff *et al.,* 2014). Ainsi, les PIP1;3 sont uniquement actives sous forme hétérotétramérique et agiraient dans la redistribution de l'eau au sein des tissus foliaires lors d'un stress hydrique (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010). Au contraire, l'expression commune de PIP1;1 et PIP1;2 favoriseraient leur interaction spécifique pour la formation d'hétérotétramères (Fetter, 2004). Chez le coton les PIP2;3 interagiraient avec les PIP2;4 et PIP2;6 pour augmenter la perméabilité membranaire à l'eau (Li *et al.,* 2013). Quelques études montrent que les PIP1 sont localisées dans la membrane plasmique uniquement dans le cas d'une co-expression avec les PIP2 (Fetter, 2004; Bellati *et al.,* 2010).

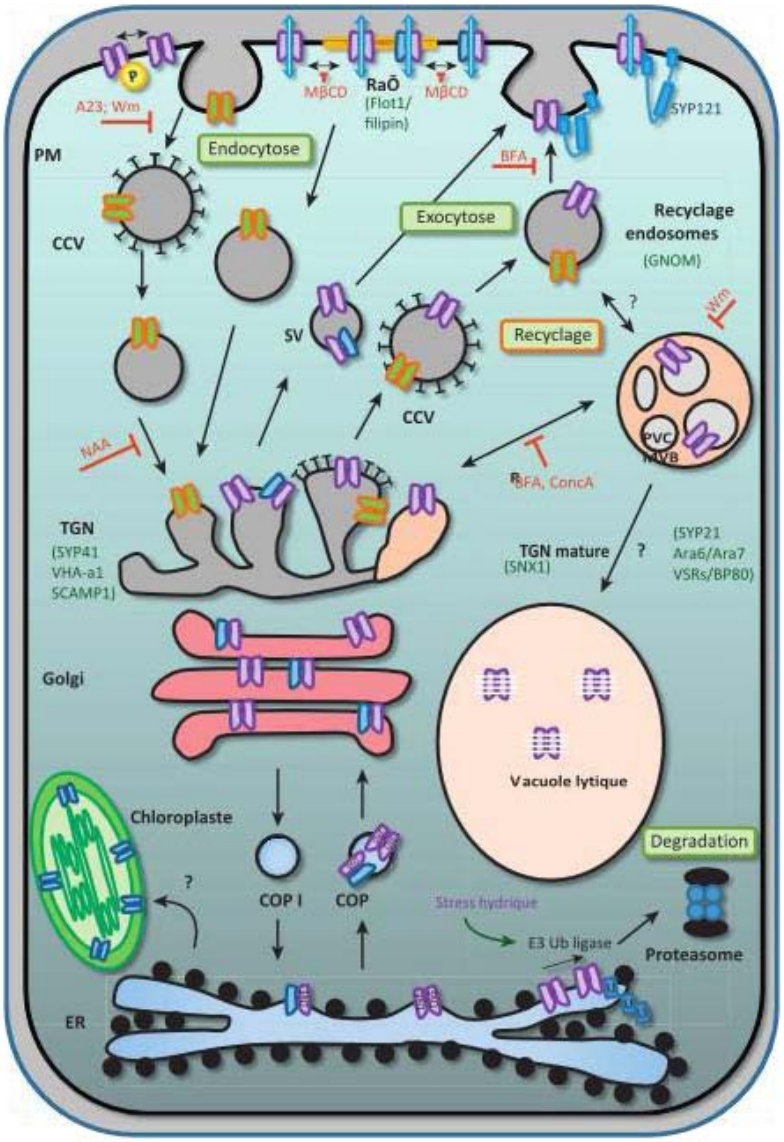


Figure 13. Régulation de l'activité des aquaporines par les voies de transport cellulaire. Les isoformes aquaporines (en bleu, vert et violet) sont reconnues à la sortie du réticulum endoplasmique (ER) puis sont transportées jusqu'à la sortie du réseau trans-golgien (TGN). Des vésicules spécifiques les prennent en charge pour leur exocytose dans la membrane plasmique (PM). La répression de leur activité peut s'effectuer par endocytose, recyclage ou dégradation. Illustration adaptée de Törnroth-Horsefield *et al.* (2010).

La variation des propriétés mécaniques et physiques des molécules d"eau, lors d"une modification du potentiel hydrique chez des plantes en sécheresse, pourrait perturber l"énergie libre entourant ces protéines et favoriserait une ouverture du pore (Ye *et al.,* 2004). Ces changements passifs d"activité pourraient suppléer les modifications de l"expression des transcrits et de l"abondance en protéines détectées lors d"une sécheresse. En effet, la diminution de la conductance hydraulique des plantes en stress hydrique est communément couplée à une expression différentielle des aquaporines (*e.g.* Chaumont et Tyerman, 2014; Maurel *et al.,* 2016; Cao *et al.,* 2013; Chitarra *et al.,* 2014). Les voies de régulations des aquaporines semblent spécifiques des isoformes, des organes et des tissus des plantes. En effet, l"expression de certaines isoformes, principalement des NIP et des XIP n"évoluent ni en fonction de stimuli biotiques ou abiotiques ni en fonction du tissu testé (Lopez *et al.,* 2012). En revanche, l"expression de l"isoforme XIP1 ;5 est fortement modulée dans les feuilles en réponse à des stress (Cohen *et al.,* 2013). De plus, le niveau d"expression est toujours le plus fort pour les trois sous-familles PIP, TIP et SIP quel que soit l"organe testé. Le niveau d"expression des TIP semble fortement influencé par le tissu, suggérant que les TIP seraient les aquaporines contribuant le plus à l"identité cellulaire (Cohen *et al.,* 2013). Le niveau d"expression des aquaporines semble dépendre de l"espèce et du niveau de stress appliqué (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010; Cocozza *et al.,* 2010; Xu *et al.,* 2014). L"expression de certaines aquaporines comme les PIP1;2 dépendrait de l"accumulation d"ABA qui permettrait leur sur-expression dans des plantes en stress hydrique, comme ce qui a été démontré chez le maïs (Parent *et al.,* 2009). En revanche, la voie de dégradation des PIP2 ;7 est activée par l"ABA durant un stress abiotique chez *Arabidopsis* (Hachez, Veljanovski, *et al.,* 2014).

La littérature offre peu d"informations concernant la voie de transduction menant à la régulation de l"expression des transcrits aquaporines. En revanche, plusieurs études se sont penchées sur la régulation de l"activité des canaux (Figure 13). L"activité des aquaporines serait principalement modulée par leur internalisation dans des vésicules endocytotiques. Ce mécanisme permettrait de réprimer leur activité temporairement, de faciliter leur recyclage ou leur dégradation (Törnroth-Horsefield *et al.,* 2010; Hachez *et al.,* 2013; Maurel *et al.,* 2015). L"internalisation et la dégradation des aquaporines, via l"intervention des complexes ubiquitine protéasome (Lee *et al.,* 2009), seraient les moyens les plus rapides pour réguler l"activité de ces canaux dans un environnement fluctuant (Boursiac, 2005). Cette voie peut être associée à la voie de sécrétion responsable du transport des protéines du réticulum endoplasmique vers le plasmalemme. Le transport vésiculaire des aquaporines PIP2 est contrôlé par une reconnaissance du motif di-acide de ces aquaporines par la sous-unité SEC24

du Coat Protein complex II (COPII) nécessaire au transport des vésicules du réticulum endoplasmique vers le Golgi (Chaumont et Tyerman 2014). Le transport des aquaporines entre le Golgi et le plasmalemme seraient, dans cette hypothèse, régulées par des syntaxines (Syntaxin of Plant ou SYP), des protéines membranaires associées à des vésicules (Vesicle-Associated Membrane Proteins ou VAMP) ou des protéines à domaines spécifiques favorisant la formation de vésicules (Chaumont et Tyerman, 2014a). Une sous-famille de SYP, appelée soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) (Uemura *et al.,* 2004), est essentielle pour la fusion de la vésicule de transport des PIP avec la membrane plasmique (Peer, 2011; Besserer *et al.,* 2012; Hachez *et al.,* 2014).

5. La plasticité des réponses au déficit hydrique

Les plantes répondent donc aux fluctuations environnementales par des ajustements phénotypiques et moléculaires qui sont en partie identifiées. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence une variabilité de l"intensité de ces réponses entre espèces et entre génotypes d"une même espèce. L"amplitude de variation d"un trait, ou plasticité, apparait comme un point clé de la réponse des plantes à leur environnement.

5.1. La notion de plasticité et son estimation

L"influence de l"environnement sur la modification des traits entre les générations appartenant au principe de sélection naturelle a toujours été une problématique importante dans la compréhension des réponses des organismes et de leur survie (Darwin, 1859). L"étude de ces variations a réellement commencé au début du XXème siècle suivant l"hypothèse que la variation des traits observables était prévisibles (Woltereck, 1909). Il était alors possible de tracer des courbes de réponse de traits mesurables en fonction des variations environnementales pour obtenir des normes de réaction. Les résultats ont peu évolués jusqu"aux travaux de Bradshaw (1965) qui ont défini les contours du concept de plasticité phénotypique. Elle est actuellement définie comme la capacité d"un génotype à produire différents phénotypes au cours de son existence en réponse à son environnement (Bradshaw 1965, Sultan 2000, Nicotra *et al.,* 2010; Settele *et al.,* 2014). Le degré de plasticité d"un trait peut prendre toutes les valeurs positives en réponse à une perturbation environnementale. Il est possible que la plasticité d"un trait soit nulle si aucune modification phénotypique n"est observée (DeWitt *et al.,* 1998; Alpert et Simms, 2002; Van Kleunen et Fischer, 2005;

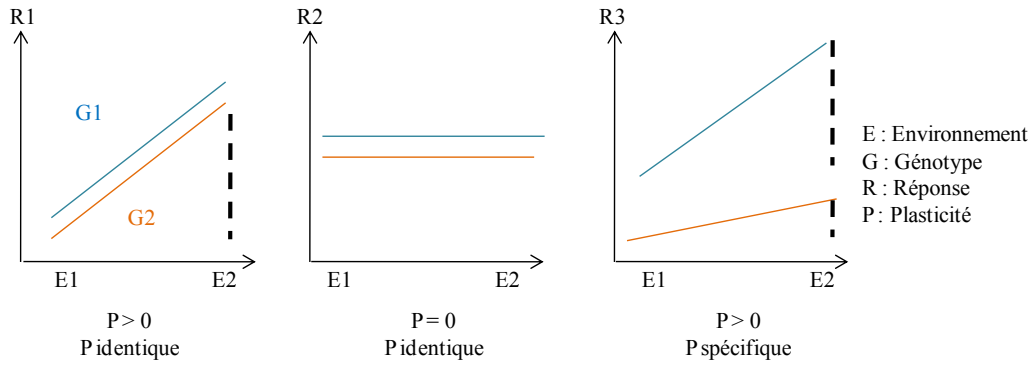


Figure 14. Estimation du degré de plasticité par les normes de réaction. Les droites représentées sont des normes de réaction reliant les réponses (R) de chaque génotype (G) entre deux environnements (E). Le degré de plasticité (P) est indiqué ainsi que sa signification, qu'elle soit spécifique ou identique entre les génotypes.

Valladares et Niinemets, 2008). De plus, le niveau de plasticité est dépendant du trait mesuré (Couso et Fernetez, 2012), de l'espèce (Iogna *et al.,* 2013, McKown *et al.,* 2014), du génotype (Bizet *et al.,* 2014; Viger *et al.,* 2016) et de l'intensité de la perturbation environnementale (Couso et Fernetez, 2012). La norme de réaction est restée longtemps le seul moyen d'estimer le degré de plasticité : un génotype est dit plastique par rapport à un autre si la pente de la norme de réaction est différente de 0 et diffère de celle de l'autre génotype (Figure 14). Les normes de réaction utilisées pour l'étude de la réponse d'un génotype à deux environnements donnent des résultats qui sont peu réalistes puisque toutes les réponses ne sont pas forcément linéaire (Valladares *et al.,* 2006). Cela permet toutefois de déterminer le niveau de plasticité d'un trait en réponse à une modification du milieu. L'ajout d'autres conditions environnementales permettrait de conclure avec justesse sur le potentiel adaptatif des plantes. Néanmoins, la complexité d'interprétation de ces courbes est telle qu'il est rarement possible d'émettre de conclusions claires.

Des indices estimant la plasticité ont été élaborés afin de prendre en compte l'amplitude de variation du trait considéré sans négliger la variation intrinsèque à chaque individu et en prenant en compte les erreurs expérimentales dues à la mesure (Valladares *et al.,* 2006). Un indice récent tenant compte de tous ces paramètres permet d'évaluer la plasticité des traits phénotypiques d'un génotype et de comparer le niveau de plasticité des traits entre génotypes dans deux conditions environnementales: le Relative Distance of Plasticity Index (RDPI). Le RDPI varie de 0 à 1 signifiant respectivement une faible et une forte plasticité d'un trait pour un génotype donné. Cet indice est calculé avec la formule suivante :

$$RDPI = \Sigma \left(|x_{ij} - x_{i'j'}| / (x_{ij} + x_{i'j'})\right) / n$$

x_{ij} correspond à la valeur de la variable dans une condition environnementale i et pour un individu j. La réponse d'un individu j' dans un deuxième environnement i' est notée $x_{i'j'}$. La différence absolue $|x_{ij} - x_{i'j'}|$ est évaluée entre chaque paire d'individus répondant à des conditions environnementales différentes, sachant que n équivaut au nombre total de paires.

5.2. Les conséquences de la plasticité

La plasticité d'un trait affecte la plante dans son fonctionnement, ce qui peut être bénéfique, néfaste ou neutre en fonction de la modification de sa valeur sélective (fitness) (DeWitt *et al.,* 1998; Alpert et Simms, 2002; Van Kleunen et Fischer, 2005; Valladares et Niinemets, 2008). La valeur sélective d'une plante correspond au potentiel adaptatif, à

l"abondance et au succès des descendants dans les générations futures et la survie de l"espèce. Ce paramètre, intégrateur de la capacité d"adaptation du génotype, ne peut être clairement quantifié. Cependant, il est possible de s"en rapprocher par le suivi d"un maximum de traits. Dans l"absolu, il serait donc intéressant de mettre en évidence la plasticité phénotypique des espèces dans tous les environnements possibles afin d"estimer le potentiel plastique global des espèces, ce qui est évidemment impossible (Nicotra *et al.,* 2010). En conséquence, de nombreuses études tendent à identifier des traits phénotypiques dont la mesure de plasticité intègrerait le potentiel de plasticité globale du génotype considéré (Nicotra *et al.,* 2010). Certains de ces proxys correspondent aux traits fonctionnels décrivant l"écologie de l"espèce comme la croissance longitudinale, la taille des graines, la durée de vie des feuilles, le Leaf Mass per Area (LMA) ou la fitness absolue, c"est-à-dire le nombre de descendants viables d"un individu (Nicotra *et al.,* 2010).

Trois principaux facteurs peuvent influencer l"impact de la plasticité sur la valeur sélective même dans le cas où le niveau de plasticité généré est bénéfique à l"individu (Chevin *et al.,* 2012). (i) Le niveau de plasticité du phénotype nouvellement produit par un génotype dans une condition environnementale précise serait en réalité désavantageux si l"homéostasie cellulaire est sur le point d"être rompue parce que c"est la première fois que l"individu rencontre ces conditions environnementales (Ghalambor *et al.,* 2007). (ii) Le coût de la plasticité généré risque de diminuer la valeur sélective du génotype (DeWitt *et al.,* 1998). Cependant, des mesures phénotypiques suggèrent que le coût des modifications est léger (Van Buskirk et Steiner, 2009). (iii) Le panel de variation de l"environnement est si important, qu"un trait dans une condition environnementale précise sera bénéfique à la valeur sélective du génotype alors qu"il ne le sera pas dans un autre milieu légèrement différent (Gavrilets et Scheiner, 1993; Reed *et al.,* 2010; Scheiner et Holt, 2012).

C"est finalement la capacité de savoir si les modifications environnementales sont prévisibles qui va déterminer si le degré de plasticité mis en place est bénéfique ou non à l"individu. En effet, il existe dans l"environnement de multiples indicateurs de variations climatiques et ces indicateurs sont perçus par l"individu. Si le niveau de perception du signal environnemental par la plante s"ajuste parfaitement avec le degré de perturbation environnementale, le niveau de plasticité de réponses mis en place sera avantageux à la plante. En revanche, un décalage entre le niveau de perception du signal et le réel degré de perturbation du milieu, générera une plasticité de trait incompatible avec les besoins de la plante et risque d"avoir un impact sur sa valeur sélective (Moran 1992; Reed *et al.,* 2010). En d"autres termes, un niveau de plasticité optimal ne sera jamais généré dans un environnement

instable et peu prédictible (DeWitt *et al.,* 1998; Steinger *et al.,* 2003; Valladares et Niinemets 2008). En revanche, la mise en place de cette plasticité optimale (pouvant être nulle) dépend du compromis entre la gamme de pression de sélection du phénotype et de la corrélation entre l"environnement de sélection et l"environnement de développement.

5.3. L"héritabilité de la plasticité à l"échelle de la population

La plasticité phénotypique d"un génotype constituerait un levier important pour la survie des plantes pérennes dans un environnement fluctuant (Ricklefs et Miller, 2005) au même titre que l"adaptation aux conditions environnementales locales (Kawecki et Ebert, 2004) et la colonisation de nouveaux territoires (Sax *et al.,* 2007). Comprendre les mécanismes de fonctionnement sous-jacents à la plasticité phénotypique permettrait de prédire le comportement des populations, leur aire de répartition et de comprendre l"impact du changement climatique sur la productivité des plantes (Nicotra *et al.,* 2010; Parmesan et Hanley 2015). Les espèces font face aux variations de leur environnement grâce à la variabilité phénotypique qui est l"association de la variabilité génétique (faisant référence à la multiplicité des génotypes dans une population) et la plasticité phénotypique (Ricklefs et Miller, 2005). Il a été montré que le niveau de plasticité phénotypique est génétiquement régulé, peut être héritable (Nicotra *et al.,* 2010) et peut avoir des conséquences à long terme sur la descendance (et donc sa valeur sélective) du génotype considéré (Chevin *et al.,* 2012). En effet, la plasticité de certains traits des plants parents peut être transmise à leur descendance, ce qui permet de conclure sur le caractère adaptatif et transmissible de la plasticité du trait étudié pour un génotype donné (Chevin *et al.,* 2012). La plasticité de certains traits deviendrait un avantage adaptatif chez des plantes répondant de manière récurrente à une modification de leur milieu. Une forte corrélation positive a été mis en évidence entre la plasticité, l"héritabilité des caractères phénotypiques de 461 génotypes de *Populus trichocarpa* et les particularités climatiques de leur environnement d"origine (McKown *et al.,* 2014). Le gradient climatique influencerait le génotype et le phénotype pour les traits relatifs à la phénologie, la synthèse de biomasse, la croissance, le niveau de photosynthèse, les caractéristiques anatomiques foliaires et la proportion des isotopes de carbone (McKown *et al.,* 2014). Cette plasticité héritable serait bénéfique pour la croissance, la reproduction et la survie du génotype considéré (Van Kleunen et Fischer 2005, Chevin et Lete 2009, Ghalambor *et al.,* 2015). Une modification de la fitness absolue de la descendance serait la conséquence d"une plasticité adaptative (Nicotra *et al.,* 2010; Thomas *et al.,* 2016).

Une théorie suggère que la sensibilité des récepteurs des stimuli environnementaux des plantes, comme les protéines G (Nilson et Assmann 2010; Kumar *et al.,* 2014), constituerait un héritage de la plasticité adaptative des parents (Nicotra *et al.,* 2010). Enfin, plusieurs études montrent que le niveau de plasticité phénotypique des espèces est positivement corrélé à la stratégie de consommation des ressources/production dans un environnement favorable (Crick et Grime, 1987; Lavorel *et al.,* 2009). Ceci découlerait de la spécialisation des génotypes à un milieu donné, ce qui pourrait devenir défavorable dans des conditions environnementales fluctuantes (Taylor et Aarssen, 1988; Lortie et Aarssen, 1996; Grassein *et al.,* 2010). La stabilité de la réponse phénotypique peut être associée à une stratégie conservative pouvant être favorable dans un environnement limitant (Valladares *et al.,* 2000). La plasticité serait un moyen de moduler les valeurs des traits phénotypiques en fonction de l"intensité des changements climatiques et soutiendrait les mécanismes d"adaptation (Nicotra *et al.,* 2010).

5.4. La régulation génétique de la plasticité

La plasticité semble plus efficace que la migration pour assurer la survie des arbres face au rapide changement climatique. Cependant, une plasticité absolue et parfaite n"a jamais été observée dans la nature d"où l"hypothèse qu"elle soit sous contrainte génétique (Thomas *et al.,* 2016). Les bases génétiques de la plasticité sont très controversées mais deux théories suggèrent (i) qu"il existerait des gènes sensitifs dont l"expression serait sensible à l"environnement et déterminerait la valeur du phénotype dans différentes conditions environnementales ou (ii) qu"il y aurait deux types de gènes de la plasticité, ceux régulant la réponse phénotypique en fonction de l"environnement (comme les facteurs de transcription) et ceux déterminant la valeur moyenne du phénotype. Les deux formes de déterminisme génétique de la plasticité phénotypique coexisteraient par la sélection des gènes sensitifs et/ou de celle des gènes de plasticité. Il semble donc pertinent lorsqu"on souhaite étudier la plasticité de considérer à la fois la variation phénotypique des traits et les modulations moléculaires, par exemple au travers des voies de signalisations moléculaires qui influencent directement les traits morphologiques (Nicotra *et al.,* 2010; Chevin *et al.,* 2012). Jusqu"à aujourd"hui, la caractérisation de la plasticité phénotypique s"est principalement bornée au phénotypage des génotypes soumis à des modifications environnementales. Cependant, grâce au développement des nouvelles techniques de séquençage (NGS), les données –omiques sont désormais accessibles et peuvent être mises en parallèle des traits phénotypiques. C"est ainsi

que deux domaines de recherche se sont récemment développés pour comprendre les régulations de la plasticité phénotypique : la recherche de Quantitative Trait Loci (QTL) et l"épigénétique. La recherche de QTL permet d"estimer le nombre et la localisation des loci sur un génome affectant la variation de traits spécifiques. Cette méthode s"est avérée particulièrement intéressante pour trouver des marqueurs génétiques de la variation phénotypique chez le peuplier (Neale et Ingvarsson, 2008; Gailing *et al.,* 2009; Fabbrini *et al.,* 2012). La robustesse de cette approche est néanmoins limitée par la variation allélique, la taille de l"échantillonnage et la faible héritabilité de certains traits (Beavis, 1998). L"épigénétique constitue une autre approche de la régulation de la plasticité observée. Elle s"intéresse à la régulation de l"expression des gènes par des marques épigénétiques permettant la compaction/décompaction de la chromatine et la l"accessibilité du promoteur des gènes (Chinnusamy et Zhu, 2009). Le but est de mettre en évidence des épiallèles, c"est-à-dire des séquences d"acide nucléique identiques entre clones d"un même génotype mais possédant des marqueurs épigénétiques qui leur sont spécifiques et induisant des modifications d"expression en fonction du milieu. Ces marqueurs épigénétiques concernent (i) les histones, qui peuvent être acétylées, phosphorylées ou ubiquitinées, (ii) le rétrocontrôle de l"expression par des petits ARN small interferring RNA ou siRNA) et (iii) des protéines de type LRR-LRK dont les marqueurs épigénétiques sont transmissibles à la descendance assurant la mémoire du stress environnemental (Chinnusamy et Zhu, 2009). En effet, une certaine portion de l"épigénome est transmissible à la descendance ce qui définit le niveau de méthylation et donc d"expression des gènes par défaut en fonction des conditions de vie des plantes parents (Alsdurf *et al.,* 2016). De plus, cette plasticité trans-générationnelle est remarquée chez des boutures provenant de plantes ayant poussé dans des milieux déficients en eau : les réponses transcriptionnelles de ces boutures sont similaires à celles de la plante mère en réponse à un nouveau stress hydrique (Raj *et al.,* 2011). Enfin, il a été montré que les modifications épigénétiques (au travers de la méthylation de l"ADN) sont corrélées à la capacité de production spécifique de six génotypes de *Populus deltoides x nigra* en condition non limitante (Gourcilleau *et al.,* 2010). Ces méthodes récentes offrent un moyen de comprendre la régulation génétique de la plasticité phénotypique qui reste encore aujourd"hui imprécise.

5.5. De la plasticité phénotypique à la plasticité transcriptionnelle

De nombreuses études ont démontré la spécificité des réponses phénotypiques des espèces et des génotypes d"une même population à une fluctuation de l"environnement (*e.g.*

Brignolas *et al.,* 2000; Larcheveque *et al.,* 2011; Iogna *et al.,* 2013). Ceci a par exemple été démontré pour deux cultivars de vigne faisant face à une fluctuation d"hydratation du sol au cours de la saison (Martorell *et al.,* 2014). La résistance hydraulique foliaire s"avère être particulièrement plastique en réponse aux changements environnementaux récurrents notamment grâce à des ajustements osmotiques. La régulation des flux d"eau suit les mêmes tendances entre les deux cultivars mais l"amplitude des réponses mesurées est caractéristique des génotypes. Un gradient de réponse et de plasticité est communément observé parmi les génotypes d"une même espèce répondant à une fluctuation environnementale (Toillon *et al.,* 2013; Bizet *et al.,* 2014). De même, l"abondance de transcrits, la chronologie des modifications transcriptionnelles et l"activation de certaines voies métaboliques en réponse à une sécheresse dépendent de l"espèce considérée. En effet, les ajustements du transcriptome foliaire et l"amplitude de l"expression génétique sont spécifiques du génotype et évoluent conjointement avec l"intensité et la durée du stress (Street *et al.,* 2006; Wilkins *et al.,* 2009; Cohen *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2012). Il apparait donc que la plasticité transcriptionnelle varie selon le gène considéré tout comme la plasticité est spécifique du trait phénotypique étudié (Letry *et al.,* 2006; Cormier *et al.,* 2010; Bizet *et al.,* 2014; Viger *et al.,* 2016). Cependant, le degré de plasticité de l"expression de chaque gène d"un génotype n"a jamais été quantifié. L"estimation de la plasticité transcriptionnelle se dessine comme une étape clé dans la compréhension de la régulation moléculaire de la plasticité phénotypique.

Objectifs

Les espèces végétales des climats tempérés seront confrontées dans un futur proche à des sécheresses édaphiques plus intenses et plus fréquentes qu"elles ne le sont actuellement. Une littérature abondante montre que le végétal ajuste sa physiologie, sa croissance, son développement et son anatomie (*e.g.* Brignolas *et al.,* 2000; Larcheveque *et al.,* 2011; Iogna *et al.,* 2013) en réponse au stress hydrique. La feuille est un élément clé dans les régulations hydriques et carbonées de la plante soumise à un déficit hydrique (Tardieu et Simonneau, 1998; Marron *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Araújo *et al.,* 2011). Ces réponses phénotypiques sont accompagnées d"importants ajustements moléculaires (Street *et al.,* 2006; Cohen *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2012). Les modulations physiologiques en réponse à un déficit hydrique ne sont pas homogènes au sein de la feuille. Des études récentes semblent même indiquer que les nervures pourraient jouer un rôle particulier dans la réponse au stress hydrique (Ksouri *et al.,* 2016; Rattanakon *et al.,* 2016; Xue *et al.,* 2016). L"objectif général de cette thèse a donc été d"analyser de manière intégrée les réponses physiologiques et transcriptionnelles de la feuille du peuplier noir à une carence hydrique progressive allant jusqu"à atteindre un niveau de déficit sévère.

Malgré l"identification de stratégies de réponses des végétaux au déficit hydrique, il semblerait que l"amplitude de variation des traits physiologiques, ou plasticité phénotypique, soit prépondérante dans la réponse des plantes (Toillon *et al.,* 2013; Bizet *et al.,* 2014). Elle serait de surcroit indispensable à la survie des arbres face aux changements climatiques (Chmura *et al.,* 2011; Rustad *et al.,* 2012; Settele *et al.,* 2014). La plasticité phénotypique a été largement étudiée mais les bases moléculaires de sa régulation restent encore floues (Valladares *et al.,* 2006; Nicotra *et al.,* 2010; Parmesan et Hanley 2015; Thomas *et al.,* 2016). Certaines études montrent également que l"expression des gènes possèdent un certain degré de plasticité (Letry *et al.,* 2006; Cormier *et al.,* 2010; Bizet *et al.,* 2014; Viger *et al.,* 2016). Cependant, la plasticité de l"expression de l"ensemble des transcrits d"un génotype en réponse à un déficit hydrique n"a jamais été quantifiée. Ainsi, nous avons souhaité réaliser une étude intégrée où les plasticités phénotypique et transcriptionnelle de la feuille seraient analysées au regard des stratégies de réponses des arbres en déficit hydrique progressif.

Afin de répondre à notre objectif général, mon travail de thèse s"est organisé autour de trois études intégrant des mécanismes de réponse et des échelles différentes et complémentaires :

(i) Etude de la réponse phénotypique du peuplier noir à un déficit hydrique chez des génotypes d"origines contrastés : identification des stratégies de réponses et du rôle de la plasticité des traits étudiés

La variabilité des réponses phénotypiques des clones de quatorze génotypes de peuplier noir a été explorée lors d"une carence hydrique progressive menant à un déficit sévère (Chapitre I). La stratégie de réponse employée par les génotypes a été caractérisée à partir des mesures physiologiques, de croissance et de développement. Elle a été confrontée au niveau de plasticité des traits morphologiques spécifiques des génotypes pour conclure sur le lien entre stratégie et niveau de plasticité.

(ii) Etude intégrée de la réponse physiologique et transcriptionnelle du peuplier noir à un déficit hydrique entre génotypes de stratégies contrastées *:* relations entre les niveaux de plasticité des traits étudiés

Les régulations transcriptomiques du limbe foliaire de clones de six génotypes de peuplier noir en carence hydrique sévère ont été mises en évidence (Chapitre II). L"analyse de ces résultats a été appuyée par une série de mesures morpho-anatomiques visant à caractériser l"état physiologique et de croissance des arbres. Puis, le niveau de plasticité transcriptionnelle a été quantifié par génotype puis mis en parallèle de la plasticité phénotypique et de la stratégie de réponse de chaque génotype.

(iii) Etude comparative de la réponse transcriptionnelle de la nervure et du limbe de la feuille de peuplier noir à un déficit hydrique

La spécificité des régulations transcriptionnelles a été explorée à l"échelle de la feuille de peuplier noir, entre nervure principale et limbe, en réponse à un déficit hydrique sévère (Chapitre III). Les fonctions cellulaires modulées par le déficit hydrique dans le limbe foliaire ont été comparées à celles de la nervure principale.

Résultats

Chapitre I

La stratégie et la plasticité de la réponse phénotypique du peuplier noir à la sécheresse

Chapitre I :
Stratégie et plasticité de la réponse phénotypique du peuplier noir à la sécheresse

Ce chapitre est constitué d"un article publié dans le journal *Physiologia Plantarum* depuis le 20 Septembre 2017.

Contexte

Les prévisions climatiques actuelles indiquent que la hausse progressive des températures de la surface terrestre risque d"induire une augmentation de la fréquence et de l"intensité des évènements climatiques extrêmes, notamment des sécheresses. En réponse, les plantes terrestres peuvent moduler de manière combinée leurs traits physiologiques, de croissance et de développement, constituant une stratégie de réponse globale aux fluctuations environnementales. L"amplitude de modification des traits de réponse à l"échelle de l"individu s"apparente à un niveau de plasticité. Afin d"étudier cette réponse phénotypique globale de la plante face à la sécheresse, notre première étude s"est focalisée sur l"analyse de la réponse de 14 génotypes de peuplier noir contrastés sur leur origine géographique. Ces génotypes ont été soumis à un déficit hydrique progressif par arrêt d"arrosage jusqu"à atteindre un niveau sévère. Les traits physiologiques, de croissance et de développement ont été mesurés tout au long de l"expérimentation et analysés globalement, en intégrant leur plasticité et la stratégie de réponses de chaque génotype.

Résultats

Les génotypes répondent au déficit hydrique sévère par un ajustement de leurs traits physiologiques permettant de limiter les pertes en eau par évapotranspiration. En conséquence, les croissances longitudinale et radiale sont limitées pendant la période de déficit hydrique. Une abscission précoce des feuilles matures pouvant atteindre 90% chez certains génotypes est observée alors qu"elle est absente chez un seul d"entre eux. Le continuum de réponses physiologiques des génotypes en carence hydrique sévère révèlent l"utilisation de deux stratégies, évitante et tolérante. Le génotype le plus tolérant maintient un développement foliaire alors que le flux d"eau dans la feuille est stoppé. En revanche, les autres génotypes, assimilés aux évitants, semblent plus sensibles au déficit car la réduction de leur développement est associé à une forte tension hydraulique augmentant les risques de rupture de la colonne d"eau.

La quantification du degré de plasticité de chaque trait mesuré par génotype a permis de mettre en évidence deux traits dont la plasticité discrimine efficacement les génotypes : le nombre de feuilles mises en place pendant le déficit et le potentiel hydrique foliaire. Le degré de plasticité des traits relatifs à la croissance est moyen alors qu"il est le plus fort pour le potentiel hydrique foliaire chez l"ensemble des génotypes. Un gradient de plasticité phénotypique est observé entre les génotypes.

Conclusions

Le peuplier noir, espèce mésohygrophile, possède des ressources génétiques lui permettant de survivre à une sécheresse édaphique intense et de courte durée. Les gammes de réponses phénotypiques et de stratégies développées par les différents génotypes montrent que la plasticité au sein de cette espèce est importante. Ces travaux révèlent que le génotype le plus tolérant à la sécheresse, possède la plus faible plasticité globale, contrairement aux génotypes les plus évitants dont la plasticité moyenne est plus forte.

Title: Integrated drought responses of black poplar: How important is phenotypic plasticity?

Marie Garavillon-Tournayre[1], Aurélie Gousset-Dupont[1], Florian Gautier[2], Pierrick Benoit[1], Pierre Conchon[1], Romain Souchal[1], David Lopez[1], Gilles Petel[1], Jean-Stéphane Venisse[1], Catherine Bastien[2], Philippe Label[1§] and Boris Fumanal[1§*]

Authors' address:

[1]Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France

[2]INRA Centre Val de Loire, UAGPF, 45075 Orléans, France

[§]Both authors contributed equally to this work

[*]Corresponding author (Boris.fumanal@uca.fr, +33 4 73 40 79 29)

Abstract

Climate change is expected to increase drought frequency and intensity what will threaten plant growth and survival. In such fluctuating environments, perennial plants respond with hydraulic and biomass adjustments, resulting in either tolerant or avoidant strategies. Plant's response to stress relies on their phenotypic plasticity. Our goal was to explore physiology of young *Populus nigra* in the context of a time-limited and progressive water deficit in regard with their growth and stress response strategies. Fourteen French one-year-old black poplar genotypes, geographically contrasted, were subjected to withholding water during eight days until severe water stress. Water fluxes (*i.e.* leaf water potentials and stomatal conductance) were analysed together with growth (*i.e.* radial and longitudinal branch growth, leaf senescence and leaf production). Phenotypic plasticity was calculated for each trait and response strategies to drought were deciphered for each genotype. Black poplar genotypes permanently were dealing with a continuum of adjusted water fluxes and growth between two extreme strategies, tolerance and avoidance. Branch growth, leaf number and leaf hydraulic potential traits had constrated plasticities, allowing genotype characterization. The most tolerant genotype to water deficit, which maintained growth, had the lowest global phenotypic plasticity. Conversely, the most sensitive and avoidant genotype ceased growth until the season's end, had the highest plasticity level. All the remaining black poplar genotypes were close to avoidance with average levels of traits plasticity. These results underpinned the role

of plasticity in black poplar response to drought and calls for its wider use into research on plant's responses to stress.

Keywords: drought, *Populus nigra*, phenotypic responses, leaf transcriptome, plasticity

Introduction

Ongoing global climate change is expected to increase both the intensity and the frequency of future extreme climatic events (Beniston *et al.,* 2007, Burkett *et al.,* 2014). In temperate countries, drought episodes will be part of the more intense climatic changes (van Mantgem *et al.,* 2009, Anderegg *et al.,* 2013, Cisneros *et al.,* 2014), and have already been held responsible for some observed forest die-offs (Bréda *et al.,* 2006).

Trees physiological responses to water deficit result in hydraulic and carbon cycle adjustments, which have already been well described (Parker 1956, Bréda *et al.,* 2006). Stomatal closure initiates the phenotypic responses to edaphic water deficit (Tardieu and Simonneau 1998, Marron *et al.,* 2002, Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007). Stomatal aperture regulation acts as a safety barrier that reduces water loss by leaf transpiration (Stalfelt 1955, Barrs 1971, Brodribb and Holbrook 2003, Araújo *et al.,* 2011). The evaporative demand of the plant persists despite water constraints, leading to a progressive tension increase in the water column (Tyree and Sperry 1988, Sellin 1999, Sack and Holbrook 2006). If water deficit is prolonged, cavitation events can occur in the vascular system (Milburn 1966, Nardini *et al.,* 2001, Brodribb and Holbrook 2003, Cochard *et al.,* 2007). Nevertheless, xylem functionality could be recovered after rewatering (McCully 1999, Brodribb and Cochard 2009). These hydraulic variations are evenly supported by morphological and physiological changes at the whole plant scale, such as a decrease of cellular elongation and surface of new leaves growing during drought (Battaglia *et al.,* 1998, Pedrol *et al.,* 2000, Marron *et al.,* 2002, Iogna *et al.,* 2013, Bizet *et al.,* 2014). Even with non-critical levels of dehydration, carbon assimilation is strongly reduced (Thomas and Eamus 1999, Lambers *et al.,* 2008, Hamanishi *et al.,* 2012). As a consequence, biomass production falls dramatically (Bray 1997, Caruso *et al.,* 2002, Monclus *et al.,* 2006, Bonhomme *et al.,* 2008), and ultimately ceases. In the final stages of severe drought response, combined hydraulic failure and carbon depletion can result in plant death (McDowell *et al.,* 2008, Sala *et al.,* 2010, Sevanto *et al.,* 2014). Plants response strategies depicted in different species are complex, owing to strong regulation of physiological traits that enables plants to tolerate water stress, and avoid instant death.

Poplar is widely used as a tree model (Bradshaw *et al.,* 2000, Taylor 2002) to study physiological responses to water deficit in plants. *Populus nigra* grows in a wide range of geographical climates (Cagelli and Lefèvre 1995), most of which are in riparian stands and wetlands (Rameau *et al.,* 1989, Isebrands and Richardson 2014). Black poplar is a pioneer species characterized by a strong colonization power during juvenile status when growth rate supported by high water consumption is the highest. This meso-hygrophilous species, used in

breeding programs, is known to be particularly vulnerable to water deficit despite its rusticity (Bréda *et al.,* 2006). Significant natural variations in phenotypic responses have been shown among European genotypes subjected to moderate drought suggesting their adaption to local climatic events (Viger *et al.,* 2016). These results were supported by an integrated study revealing that genetic and morphological characteristics of 13 European *Populus nigra* populations should depend on adaptive differentiation and historic local events (DeWoody *et al.,* 2015). In addition, French genotypes exhibiting the greatest genetic admixture (DeWoody *et al.,* 2015) showed heterogeneous drought responses (Viger *et al.,* 2016). Regarding to these results, conclusions should be tried on larger set of French black poplar genotypes responding to drought to explore their phenotypic and genetic particularities, and estimate the degree of the response variability. Two water deficit response strategies have been identified in poplar species and hybrids regarding to water fluxes and biomass production parameters: tolerance and avoidance (Marron *et al.,* 2003, Monclus *et al.,* 2006, Giovannelli *et al.,* 2007). The tolerant strategy is defined by the capacity of a perennial plant to sustain growth and biomass production by maintained stomatal aperture or a loosely regulated one (Passioura 2002), while limiting dehydration by leaf osmotic adjustments (Gebre *et al.,* 1994, Marron *et al.,* 2002, Hanin *et al.,* 2011, Barchet *et al.,* 2013, Martorell *et al.,* 2014). The avoidant strategy is based on limiting water loss through quick stomatal closure and/or leaf abscission (Couso and Fernandez 2012). Similar strategies have been identified in other poplar species, with a broad range of variations in physiological trait regulation (Brignolas *et al.,* 2000); notably, stomatal sensitivity (Hamanishi *et al.,* 2012), leaf abscission, leaf production (Marron *et al.,* 2002) and general plant growth (Giovannelli *et al.,* 2007). However, there is a continuum of responses depicting these two strategies according to individuals in a population, or even in the same individual according the environment. To cope with environmental changes, perennial plants have three options: local adaptation (Kawecki and Ebert 2004), new colonization (Sax *et al.,* 2007) or phenotypic plasticity. Phenotypic plasticity is defined as the capacity of a genotype to produce different phenotypes in response to environmental conditions (Bradshaw 1965, Sultan 2000, Nicotra *et al.,* 2010). A part of the total phenotypic plasticity can be evaluated using many indices (Valladares *et al.,* 2006) focused on plant traits. The level of plasticity depends on species (Iogna *et al.,* 2013, McKown *et al.,* 2014), genotypes (Bizet *et al.,* 2014), the considered plant trait (Couso and Fernandez 2012) and growth conditions.

Levels of phenotypic plasticity can become adaptive and inheritable especially when expressed by plants under recurrent environmental modifications. Adaptive plasticity can benefit survival, growth and reproduction (Van Kleunen and Fischer 2005, Chevin and Lande

2009, Ghalambor *et al.,* 2015), as suggested for adaptive receptor sensitivity to environmental cues (Nicotra *et al.,* 2010). Energy consumption required for the modification of a stable trait must be proportional to the intensity of environmental stress (Valladares and Niinemets 2008) to avoid ineffective extreme phenotypic plasticity (DeWitt *et al.,* 1998, Steinger *et al.,* 2003). The environmental predictability, *i.e.* the match between environmental cues and the level of plant phenotypic plasticity, appears crucial for the efficiency of plant phenotypic adjustments (Moran 1992, Reed *et al.,* 2010). In an environment which will undergo drastic changes, as expected in the future, plant plasticity should play a major role in plant interactions, selection pressure, competition for resources and plant persistence (Parmesan and Hanley 2015).

The aim of this study was to characterize the main early physiological responses of young black poplar during a time-limited progressive drought. The followed goals were (i) to evaluate the extent of phenotypic plasticity involvement in drought responses, and (ii) to decipher relationships between phenotypic plasticity and response strategies to water deficit. Fourteen black poplar genotypes, from contrasted geographical origins in France, were subjected to water withholding until they reached a severe water deficit, as measured by predawn leaf water potential. Physiological and growth traits were monitored during the water treatment. Genotype strategies integrating trait plasticities were studied using a multivariate analysis.

Table 1. Annual averages of climatic parameters between 1981 and 2010 defining the native environmental conditions of the 14 black poplar genotypes studied.

Genotype	Latitude	Longitude	Sampling origin	Average temperature (°C)		Cumulative rainfall			Total sunshine	
				Minimal	Maximum	Height (mm)	Number of days *	Height (mm), for the hottest month **	Duration (h)	Number of days *
STR-10	48.37	7.49	Strasbourg	6.6	15.3	665.0	114.9	72.7	1692.7	59.8
STR-16	48.37	7.49	Strasbourg	6.6	15.3	665.0	114.9	72.7	1692.7	59.8
ERS-05	48.25	7.43	Erstein	6.1	15.7	607.3	103.9	66.8	1799.0	62.2
ERS-10	48.25	7.43	Erstein	6.1	15.7	607.3	103.9	66.8	1799.0	62.2
ERS-12	48.25	7.43	Erstein	6.1	15.7	607.3	103.9	66.8	1799.0	62.2
RHN-35	48.16	7.41	Rhinau	6.1	15.7	607.3	103.9	66.8	1799.0	62.2
RHN-38	48.16	7.41	Rhinau	6.1	15.7	607.3	103.9	66.8	1799.0	62.2
SPM-12	47.51	1.48	Saint-Pryvé Saint-Mesmin	5.8	16.7	702.3	113.8	59.9	1743.6	60.3
SPM-28	47.51	1.48	Saint-Pryvé-Saint-Mesmin	5.8	16.7	702.3	113.8	59.9	1743.6	60.3
SPM-40	47.51	1.48	Saint-Pryvé Saint-Mesmin	5.8	16.7	702.3	113.8	59.9	1743.6	60.3
ALL-29	46.24	3.19	Val d'Allier	6.0	16.7	779.5	116.7	71.6	1861.7	68.7
77-308	45.54	5.12	Meximieux	8.1	16.9	831.9	104.1	77.7	2001.9	81.1
72-501	45.35	5.36	Saint-Genix sur Guiers	6.3	16.2	934.3	106.4	86.6	2065.9	88.1
BDG	44.04	0.54	Garonne	8.4	18.5	712.2	107.1	51.3	1982.4	75.7

* A minimum of 1 mm of rainfall and 120 $W.m^{-2}$ of sunshine per day was taken into account for number of days counting.

** The hottest month was July for each sampling origin.

Materials and methods

Plant material and experimental design

Fourteen European *Populus nigra* genotypes were sampled by INRA UR 0588 AGPF (Orléans, France) in natural riparian populations (Villar and Forestier 2009) from different French river basins characterized by different climatic conditions (Table 1). They were kept in annually coppiced mother-stocks at the ONF nursery of Guéméné-Penfao (47.62 N, −1.84 E). Eight cuttings per genotype (1 cm collar diameters, 30 cm height) were planted in 10 L pots in spring 2012. Pot substrate was composed of ⅓ black peat and ⅔ local Limagne topsoil, added with 20 g of Osmocot Pro fertilizer (17:11:10 N, P, K, 2 MgO). Pots were set up in the common garden at Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand (45.76 N, 3.12 E) using a complete randomized block design. Trees were spaced 1 m apart and surrounded by additional randomized clones from the different genotypes tested in order to minimize edge effects. Pots were watered automatically twice a day (0.5 L in the morning and afternoon) until the onset of water deficit. The experiment ran from 11 Jun. 2013 to 18 Jun. 2013 on 107 one-year-old black poplars (401 ± 10 leaves, 16 ± 1 mm of stem diameter). Trees height before experiment start was not different between clones within genotypes (P = 0.127). However, two genotypes among the fourteen's had significantly different heights (P = 0.002) from 75 ± 6 cm for ERS-12 to 125 ± 7 cm for SPM-40. Four clones per genotype were subjected to water deficit (except two for 77-308 and ERS-12 genotypes) by withholding water until all genotypes exceeded at least a predawn leaf water potential of -2 MPa, corresponding to 8-day treatment and severe water deficit (Marron *et al.,* 2003). Pots were weighed daily to check water deficit (mean water loss of 1.6% ± 0.1 per day and per pot; Appendix Fig. S1). Four control trees per genotype were well-watered (only three ERS-12 trees). The soil of droughted trees was covered with plastic bags sealed with silicone at the tree collar to prevent rehydration by rain and morning dew. At the end of the experiment, the trees were re-watered and monitored until the season's end (19 Oct. 2013).

Water movements

Predawn and midday leaf water potential (Ψ_{pd} and Ψ_{md}, expressed in MPa) were measured on rank-four leaves from the top with a Scholander pressure chamber (Model 600, PMS Instrument Company, USA) every two days. Ψ_{pd} was measured from 04 h 30 to 05 h 15, *i.e.* before sunrise, (i) to control steady state of water status along the soil-plant-atmosphere

continuum for control trees and (ii) to reach at least Ψ_{pd} = -2 MPa for the droughted trees. Ψ_{md} was measured between 13 h 00 and 13 h 45, *i.e.* at peak transpiration.

Stomatal conductance (g_s, mmol m^{-2} s^{-1}) was measured daily between 13 h 00 and 13 h 45 on rank-four leaves using an SC-1 Leaf Porometer (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA).

Plant growth and development

Poplar architecture features sylleptic and proleptic branching (Hallé *et al.,* 1978, Ceulemans *et al.,* 1990, (Wu and Hinckley 2001). Tree organs were annotated to take into account these two branching processes: the stem, the longest past year sylleptic shoot (named main branch) and one proleptic shoot developed on the main branch (named new branch). Measurements of radial growth (D, at 5 cm from the collar or terminal bud scar) and longitudinal growth (L) were performed during the water deficit period.

Total leaf number per tree were counting before and after the water deficit then divided by leaf number at the beginning of the experiment (T, %). Apical meristems were marked before the experiment in order to count the number of new leaves produced during the stress on the new branch (N). Three rank-four leaves per tree grown during the water deficit were sampled (except one stressed leaf for 77-308 and BDG, and none for stressed ERS-12 trees owing to lack of leaves) to evaluate the specific leaf area (SLA). Then for each fresh leaf, leaf area (A, mm^2) was measured using ImageJ software (version 1.48; Schneider *et al.,* 2012) and leaf dry mass (M, mg) was obtained after four days drying at 60°C. Mean SLA (mm^{-2} mg^{-1}) per tree was calculated as SLA = A / M.

Statistical analysis

The effects of water deficit and genotype were analysed over time on stomatal conductance, predawn and midday leaf water potentials of trees using mixed effects linear model and contrast analysis using post-Hoc Tukey's test.

Physiological and growth traits measured at the maximum water deficit (Day 8) were analysed using a multivariate principal component analysis (PCA) on standardised values. Shapiro-Wilk's test was used to check Gaussian distribution for all variables. Climatic variables (θ_{min} = minimum annual average temperature; θ_{max} = maximum annual average temperature; *Rain* = mean number of rainy days per years; *Light* = mean number of sunny days per years) describing the original environment of each genotype and their height (H = trees height before experiment) were added to the PCA as supplementary variables. Eigen

values were calculated for the first five dimensions. The contributions of each variable (C_{var}) and each individual (C_{ind}) to these dimensions were compared with theoretical equivalent contribution (C_{th}), defined as: C_{th} = 1 / variable number. Variables and individuals with a significant contribution ($C_{var} > C_{th}$ or $C_{ind} > C_{th}$) to the dimensions and a quality of representation (range of explicative dispersion, $\cos^2$) in the plane above 0.60 were retained to help describe genotype behaviours during the water deficit. *V*-test results (Lebart *et al.,* 1995) singled out genotypes belonging to the first two dimensions. These screening criteria allowed choosing the most informative traits, which were then compared among treatment and between genotypes using two-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test.

The plasticity of the most informative physiological and growth trait (D, L, N, T, Ψ_{pd} and Ψ_{md}) was calculated using the relative distance plasticity index (RDPI; Valladares *et al.,* 2006) varying from 0 to 1 (respectively low and high plasticity) for each variable and genotype as: RDPI = $\Sigma\ (|x_{ij} - x_{i'j'}| / (x_{ij} + x_{i'j'}))/n$, where x_{ij} defines the value of a variable in treatment i (well-watered or droughted) for trees j, $|x_{ij} - x_{i'j'}|$ is the absolute difference obtained between all pairs of trees from two different treatments, and n is the total number of pairs. The corresponding variables were named after their physiological counterpart and prefixed p_. The relationships of trait plasticity indexes were analysed using a PCA. Kruskal and Wallis test has been performed on each RDPI trait to estimate the genotype effect (Appendix Table S3).

Statistical analysis were performed using R software version 3.2.1 with $\alpha = 0.05$. FactoMineR (Le *et al.,* 2008) and Factoexra R packages were used to perform a PCA analysis and visualized results.

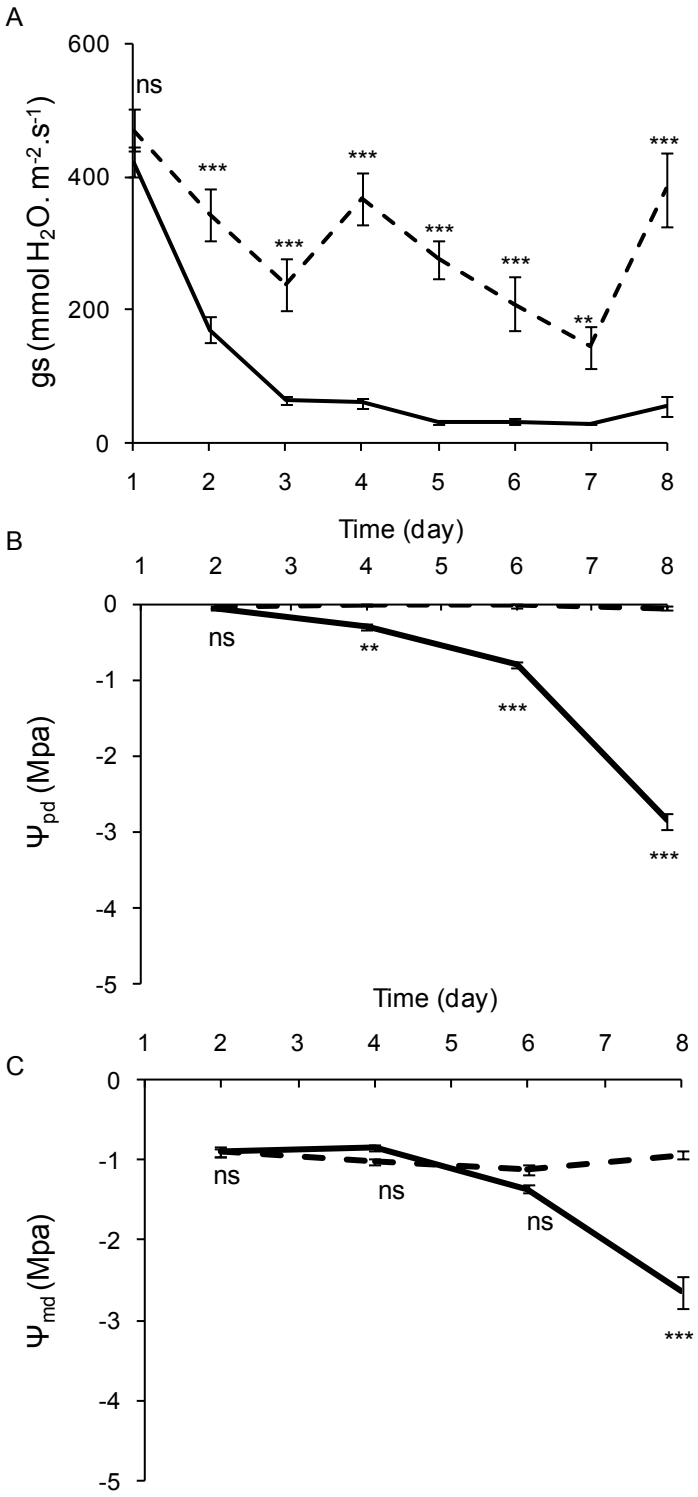


Fig. 1. Mean (± SE) stomatal conductance (A) and predawn (B) and midday (C) leaf water potential of black poplars in well-watered (dotted line) and water deficit (solid line) conditions. Results of mixed effects linear model and pot-Hoc Tukey's test were indicated (*0.01 < P < 0.05; ** 0.01 < P < 0.001 ;***P < 0.001; ns = non-significant).

Results

Evolution of physiological plant status during progressive water deficit

Stomatal conductance (gs), predawn (Ψ_{pd}) and midday (Ψ_{md}) leaf water potentials were significantly different ($P < 0.001$) between well-watered and droughted trees over time (Fig. 1). No significant genotype effect has been detected over time on Ψ_{pd} ($P = 0.150$) and Ψ_{md} ($P = 0.142$). g_s of trees under water deficit significantly fell throughout the time course compared to well-watered one's, from 171 ± 19 at Day 2 to 32 ± 3 mmol H_2O m^{-2} s^{-1} at Day 3, and then stabilized until the end of the experiment (Fig. 1A). A notable variability in g_s was also observed on well-watered trees during the experiment (from 146 ± 31 to 512 ± 49 mmol m^{-2} s^{-1}). Predawn and midday leaf water potentials of well-watered poplars remained stable during the progressive water treatment, respectively Ψ_{pd} = 0 MPa and Ψ_{md} = -1 MPa (Fig. 1B-C). The expected decrease of Ψ_{pd} and Ψ_{md} were significant respectively after four ($P < 0.001$) and eight ($P < 0.001$) days of water deficit, reaching -2.8 ± 0.1 MPa for Ψ_{pd} and -2.6 ± 0.2 MPa for Ψ_{md} at Day 8.

Whole trait relationships

The global response of trees to severe water deficit (Day 8) was studied by PCA of the eight measured physiological and growth traits along with five supplementary quantitative variables. On the main plane representing 62% of global variance (Fig. 2A), individuals projection revealed the effect of water deficit on individual clustering, and split individuals into two groups along the first PCA dimension (correlation = 0.83, $P < 0.001$). The underlying structure of variance was summarized by few traits (Fig. 2B): total leaf number variation (T) and predawn leaf water potential (Ψ_{pd}). They were respectively positively and negatively correlated with the first dimension. Midday leaf water potential (Ψ_{md}), radial (D) and longitudinal (L) growths and number of new leaves per new branch (N) contribute to the variance of the first axis in a lesser extent. Specific Leaf Area (SLA) and stomatal conductance (gs) did not bring significant contribution to the variance on the main plane. Projecting genotypes onto the PCA main plane revealed weak correlation with the second dimension (correlation = 0.11, $P > 0.05$). Climatic parameters describing the original environment of genotypes and the height of trees, analysed as supplementary variables, did not yielded any significant contribution to global variance on the main PCA plane.

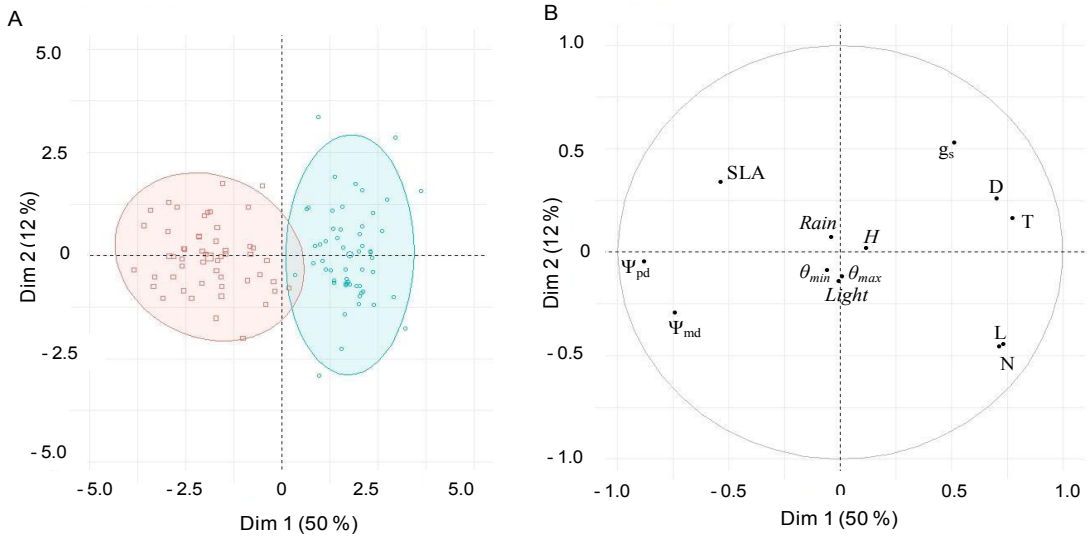


Fig. 2. PCA on physiological and growth traits of 14 black poplar genotypes at the maximal water deficit (day 8). Individual trees data projected on the first two PCA dimensions representing 62% of global variance (A). Droughted (red dots) and well-watered (blue dots) trees with their 95% confidence ellipses. (B) Eight physiological and growth variables (with correlation circles) projected on the two first PCA dimensions, including five climatic and tree traits supplementary variables (italic). g_s = stomatal conductance; Ψ_{pd} = predawn leaf water potential; Ψ_{md} = midday leaf water potential; D = main branch diameter gain; L = new branch length gain; T = total leaf number variation; N = number of new leaves per branch; SLA = specific leaf area; θ_{min} = minimum annual average temperature; θ_{max} = maximum annual average temperature; *Rain* = mean number of rainy days per years; *Light* = mean number of sunny days per years; *H* = tree height before experiment.

Table 2. Test of genotype and treatment effect on physiological and growth traits of 14 black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8) using two-way ANOVA. *Significant difference for P < 0.05.

	Two-way ANOVA *P-values* significance		
Description of physiological traits	Genotype	Treatment	Genotype x Treatment
Water movement traits			
Stomatal conductance (gs, mmol m^{-2} s^{-1})	0.175	<0.001*	0.458
Predawn leaf water potential (Ψ_{pd}, Mpa)	0.096	<0.001*	0.369
Midday leaf water potential (Ψ_{md}, Mpa)	0.602	<0.001*	0.726
Growth and development traits			
Branch			
Main branch diameter gain (D, mm)	0.030*	<0.001*	0.294
New branch length gain (L, cm)	0.009*	<0.001*	0.039*
Leaf			
Total leaf number variation (T, %)	0.135	<0.001*	0.018*
Number of new leaves per branch (N)	0.092	<0.001*	0.556

Water movements

Trees lost on average 7.7 ± 0.3% of water content ($P < 0.001$) when water deficit was maximal at Day 8 (Appendix Fig. S1). There were no significant differences between genotypes ($P > 0.05$).

Water deficit induced a steady decrease of Ψ_{pd} in droughted trees until Day 8 ($P < 0.001$; Table 2) reaching different rates according to genotype: from -1.9 ± 0.2 MPa for SPM-12 to -4.1 ± 0.3 MPa for ERS-12 (Fig. 3). At Day 8, Ψ_{md} of well-watered trees ranged from -0.7 ± 0.1 MPa to -1.4 ± 0.2 MPa between genotypes. Among droughted trees, Ψ_{md} fell ($P < 0.001$; Table 2) from -1.8 ± 0.2 MPa for SPM-12 to -3.7 ± 0.3 MPa for ERS-12 genotype (Fig. 3), without any significant differences among genotypes ($P > 0.05$).

Plant growth and development

Total leaf number variation (T) increased by 53 ± 16% for control trees on average (from 414 ± 14 to 516 ± 20 leaves; Fig. 4A). It peaked on average at 35% ± 5 among droughted trees (from 388 ± 14 to 229 ± 20 leaves; $P < 0.001$; Table 2) reaching 90% for genotypes 77-308 and ERS-12 (Fig. 4A) due to leaf fall following drought stress. Genotype and treatment effects interacted significantly for this trait ($P = 0.018$; Table 2).

Globally, number of new leaves (N) was significantly reduced by water deficit ($P < 0.001$; Table 2), although this trend was not always significant at the genotype level. However, N of two droughted genotypes, BDG and STR-16 ($P < 0.01$; Fig.4B), decreased by two-fold compared to control trees. Similarly, a significant increase of SLA in water deficit treatment was observed ($P < 0.001$; Table 2; Appendix Fig. S2) but no difference was noted between genotypes.

The main effect of water deficit was clearly detected on longitudinal (L) and radial (D) growth ($P < 0.001$; Table 2). However, only genotype x treatment interaction was significantly detected for L ($P = 0.039$; Table 2). When examined at the genotype level, decrease in L under water deficit was significant for BDG, RHN-35, SPM-28 and SPM-40 ($P < 0.05$; Appendix Table S1). The main effect of water deficit on D decrease was the most marked in STR-10 and RHN-35 genotypes ($P < 0.05$; Appendix Table S1).

Phenotypic plasticity

Plasticity of physiological and growth traits was derived as Relative Distance of Plasticity Index (RDPI) for each genotype, and analysed using PCA (Fig. 5). Variance was mostly explained by the first three PCA dimensions (26%, 22% and 21%, respectively). The

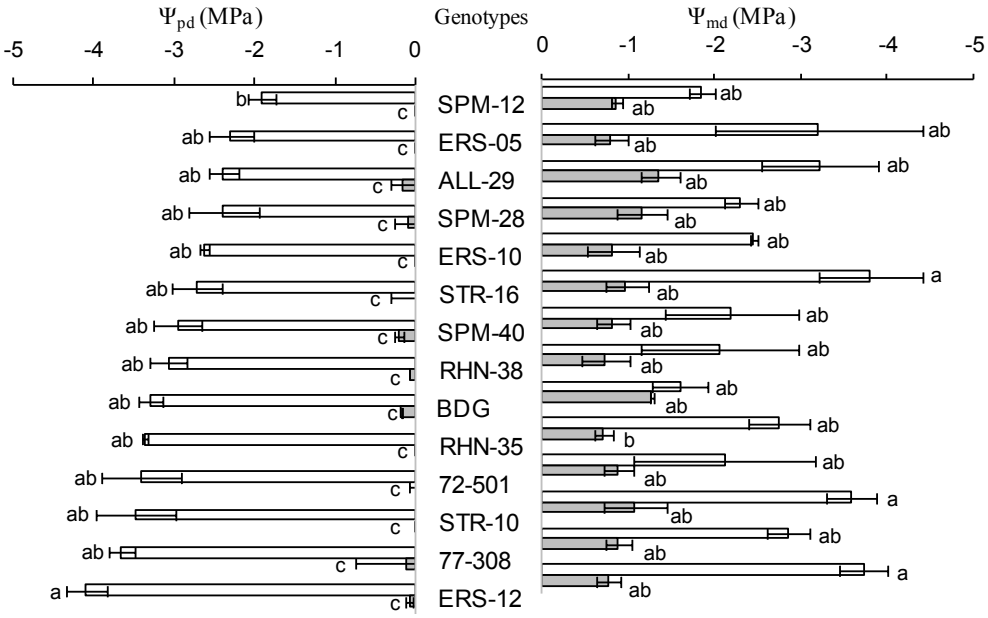


Fig. 3. Mean (± SE) predawn (Ψ_{pd}) and midday (Ψ_{md}) leaf water potential measured on 14 well-watered (grey bars) and droughted (white bars) black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8). Results of two-way ANOVA and post-Hoc HSD Tukey's test were indicated by letters. Same letters indicate no differences between groups.

first two dimensions represented 48% of global variance (Fig. 5A). p_L and p_Ψ_{pd} contributed weakly to the variance of the first dimension (29% and 27%; Appendix Table S2). The variance represented on the second dimension was mainly due to p_T contributing to 47%, followed by p_Ψ_{md}, contributing to 18%. The genotype factor explained 55%, 54% and 30% of the variance of the first three dimensions respectively (Fig. 5C-D). ERS-05 was significantly and positively correlated to the first dimension ($P = 0.01$) although SPM40 ($P = 0.01$) and BDG ($P = 0.002$) were negatively correlated (Fig. 5C). ERS-12 and RHN-35 were positively correlated with the second dimension ($0.03 < P < 0.04$) and anti-correlated with SPM-12, SPM-40 and ALL-29 ($P = 0.02$). BDG was the only genotype significantly correlated with the third dimension ($P = 0.01$). p_Ψ_{pd}, p_T and p_D were associated with the genotypes significantly well represented on the first three dimensions. The significant genotype effect was confirmed on these three traits ($P < 0.05$; Appendix Table S3).

PCA highlighted four traits for which plasticity was genotype-specific: p_Ψ_{pd}, p_D, p_L and p_T. p_Ψ_{pd} showed the highest RDPI (Table 3) among all the genotypes (RDPI > 0.9). p_D ranged between 0.18 ± 0.05 (72-501) and 0.57 ± 0.02 (77-308), p_L from 0.27 ± 0.03 (ERS-05) and 0.67 ± 0.19 (SPM-28), and p_T from 0.13 ± 0.02 (SPM-12) to 0.91 ± 0.01 (ERS-12). p_Ψ_{md} was lower for BDG (0.15 ± 0.08) than for the other genotypes (from 0.36 ± 0.02 for SPM-12 to 0.66 ± 0.01 for ERS-12). p_N ranged between 0.20 ± 0.04 (SPM-12) and 0.65 ± 0.13 (STR-16).

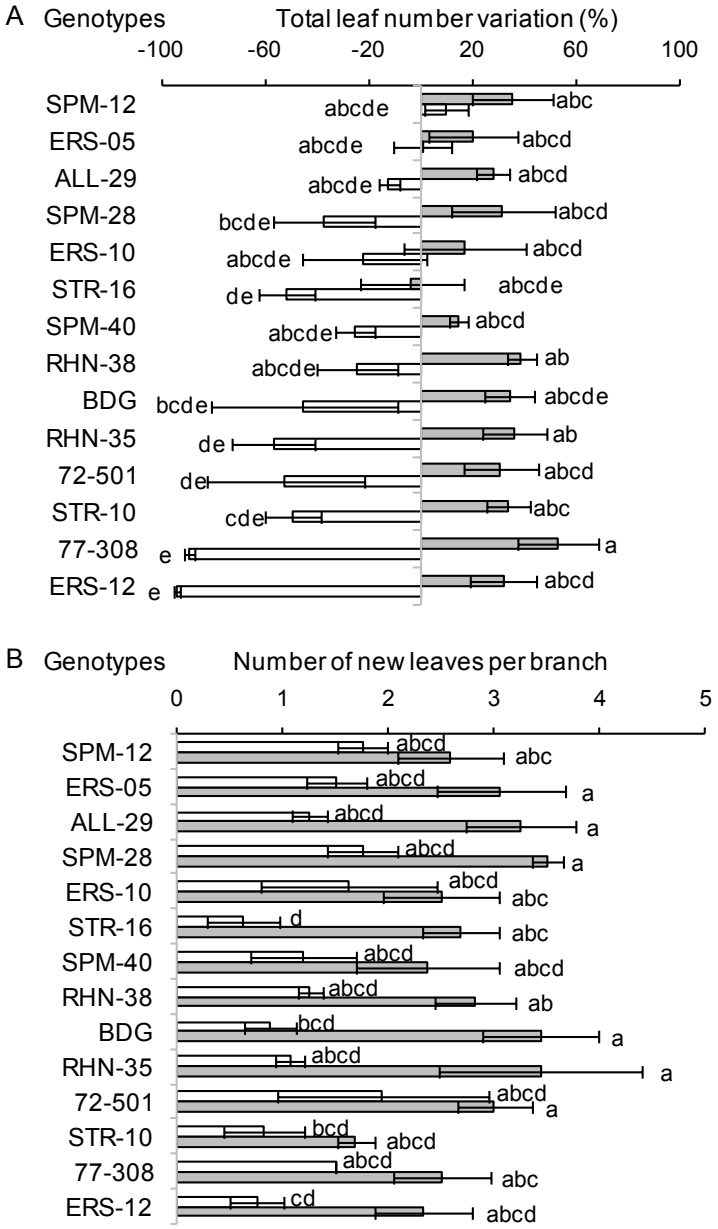


Fig. 4. Mean (± SE) total leaf number variation (A) and number of new leaves per branch (B) of 14 well-watered (grey bars) and droughted (white bars) black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8). Results of two-way ANOVA and post-Hoc HSD Tukey's test were indicated by letters. Same letters indicate no differences between groups.

Discussion

Black poplars belong to riparian species with high evaporative demand during juvenile stage (Bazzaz 1979). Surprisingly, this pioneer species could also colonize dry soil habitats (Rameau *et al.,* 1989). One way to explore its acclimatization capacity face to future climate disturbances is to study its response trait plasticity. In the present study, 14 contrasting native black poplar genotypes were exposed to progressive severe water deficit to explore the diversity of responses of this species. Our main goal was to evaluate the importance of plasticity in plant response strategy to water deficit.

Black poplars were severely stressed after an 8-day water deficit

Considering global variance of each physiological trait measured (Fig. 2), an 8-day water deficit was enough to induce a strong response for all the 14 black poplar genotypes. They were characterized by well-known changes in physiological traits, confirming their reached severe water deficit status as reported for many species. We observed a rapid decrease in stomatal conductance (Tardieu and Simonneau 1998, Marron *et al.,* 2002, Marron *et al.,* 2003, Aasamaa *et al.,* 2004, Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007, Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010), a progressive increase of tension in the water column (Shackel *et al.,* 1997, Fu *et al.,* 2006, Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010, Cocozza *et al.,* 2010, Barchet*et al.,* 2013), leaf abscission (Marron *et al.,* 2002, Viger *et al.,* 2016), and a reduction of radial and longitudinal growth (Morabito *et al.,* 2006, Giovannelli *et al.,* 2007). A relation between the decrease of water fluxes (g_s, Ψ_{pd}, Ψ_{md}; Fig. 2B) and growth traits (T, N) was observed in all the genotypes, as previously described by Lambs *et al.,* (2006), Chamaillard *et al.,* (2011) and Viger *et al.,* (2016) on other black poplar genotypes.

Black poplar genotypes exhibited a wide range of response to water deficit

At the genotype level, variability of response to water deficit was detectable. ERS-12, 77-308, and STR-10 regulated mostly water movements (Ψ_{pd}, Ψ_{md}), while STR-16 and BDG were mainly characterized by a decrease of growth (T, N). Little changes occurred in SPM-12, which sustained the highest Ψ_{pd} (-1.9 MPa), still producing new leaves and keeping existing leaves during water deficit. On the other end of the response gradient, ERS-12, 77-308, and STR-10 experienced Ψ_{pd} around -4 MPa and stopped growing. To ensure that all the genotypes were able to continue growth as normal following, we re-watered them and measured their growth restart before the end of the growing season (Appendix Table S1). At that point, one genotype (ERS-12) failed to recover its growth, possibly because of vascular

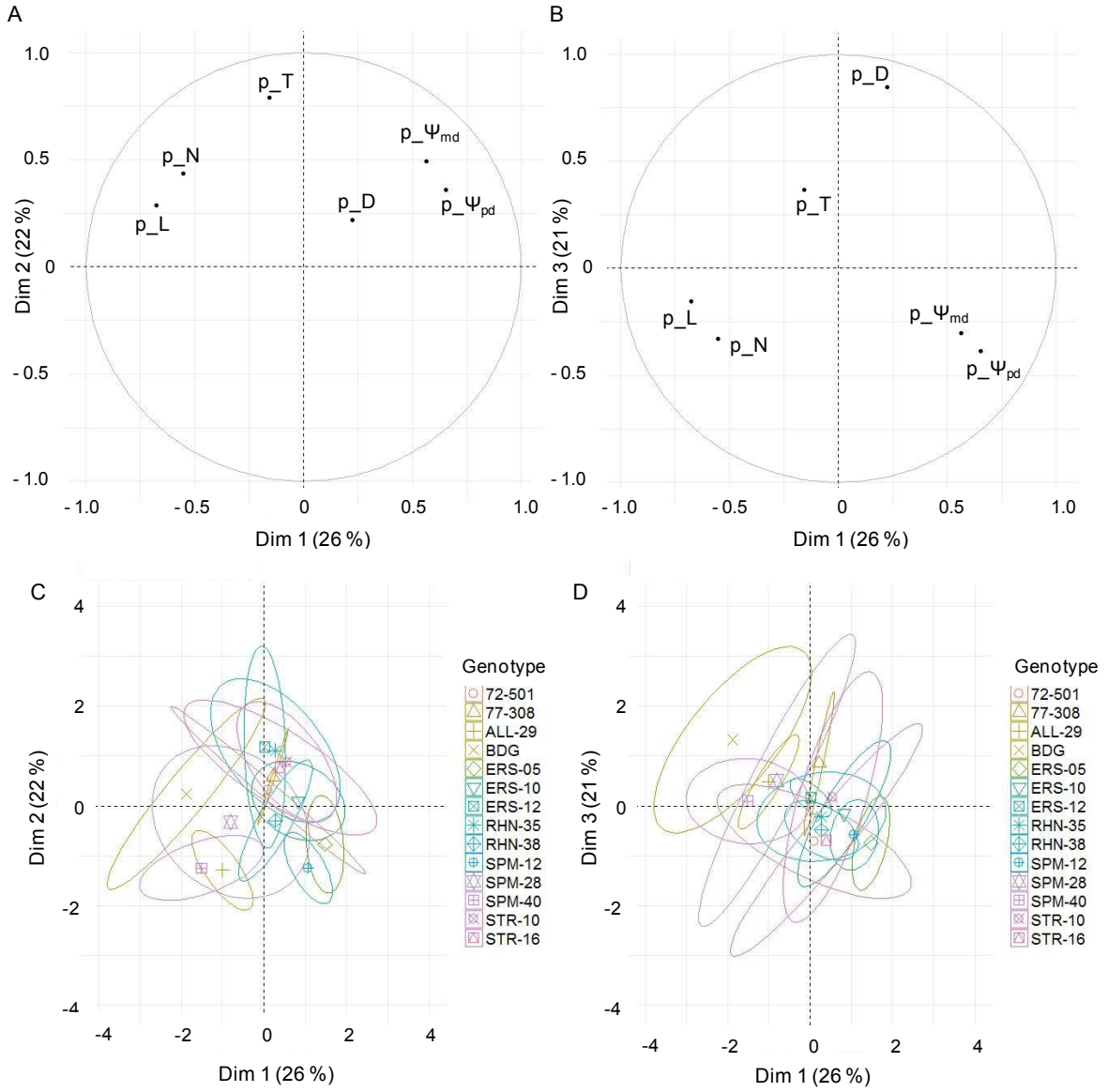


Fig. 5. Principal Component Analysis (PCA) of phenotypic plasticity as a relative distance of plasticity index (RDPI) calculated for six traits on 14 black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8). Data structuring is detected on (A, C) the first plane (dimension 1 and 2) and (B, D) the second plane (dimensions 1 and 3). (A, B) Correlation circles of traits RDPI on the first three dimensions. (C, D) Trees are identified according to genotype factor on the two planes with 95% confidence ellipses drawn around each genotype barycenter. p_ = plasticity of; Ψ_{pd} = predawn leaf water potential; Ψ_{md} = midday leaf water potential; D = main branch diameter gain; L = new branch length gain; T = total leaf number variation; N = number of new leaves per branch.

system and/or photosynthesis pathway damages (Fichot *et al.,* 2015, Jajic *et al.,* 2015, Chen *et al.,* 2016). The following year, we checked the growth of all the plants. All the genotypes, even those experiencing severe stress with extreme Ψ_{pd} were able to recover from this severe water deficit (including ERS-12 plants). Similar observations have been made on severely droughted poplar species (Brignolas *et al.,* 2000, Marron *et al.,* 2003, Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010, Cocozza *et al.,* 2010, Barchet *et al.,* 2013).

Genotypes modulated evapotranspiration similarly during water deficit: it is thus surprising that SPM-12 has been able to grow in such conditions. Black poplars mostly responded by leaf fall during water deficit except for two genotypes (SPM-12 and ERS-05). In black poplars (Regier *et al.,* 2009, Cocozza *et al.,* 2010) and several other poplar species (Pelah *et al.,* 1997, Marron *et al.,* 2002, Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007, Barchet *et al.,* 2013, Cao *et al.,* 2013, Hamanishi *et al.,* 2015), authors have reported that species without leaf fall under drought may favor solute availability and sustain cellular homeostasis. The question remains unanswered for SPM-12, in which growth was maintained during water deficit.

SPM-12 strategy face to water deficit conditions was considered as "tolerant" according to previous findings on poplar species (Marron *et al.,* 2002, Monclus *et al.,* 2006, Cocozza *et al.,* 2010). By contrast, the strategy of ERS-12 was closer to the description of "avoidant", as described for *P. simonii* × *P. Balsamifera* (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010). Based on this definition, the twelve other black poplar genotypes could also be regarded as "avoidant". Although poplar is known to be meso-hygrophilous to slightly hygrophilous in regularly flooded environments, it can sustain growth under occasional short drought periods, in accordance with some reports of French black poplar colonizing dry substrates (Rameau *et al.,* 1989).

Phenotypic plasticity related to drought strategy was genotype-specific

Phenotypic plasticity (Fig. 5) was evaluated for traits related to water movements (p_Ψ_{pd}, p_Ψ_{md}) and growth (p_L, p_D, p_T, p_N). Multivariate analysis retained p_Ψ_{pd}, p_D, p_L and p_T as genotype-specific, characterizing the diversity of plasticity responses of black poplar genotypes. Growth traits show medium plasticity levels as previously observed for black poplar genotypes (Guet *et al.,* 2015), *Populus* × *euramericana* (Bizet *et al.,* 2014), *Pinus pinaster* (Alía *et al.,* 1997, Lamy *et al.,* 2014), *Pinus halepensis* (Baquedano *et al.,* 2008) or *Quercus coccifera*. Discriminatory power of plasticities among genotypes was higher for the growth traits p_D, p_T, p_L than for p_Ψ_{pd}, owing to large differences in plasticity

Table 3. Mean (± SE) relative distance of plasticity index (RDPI) of 14 black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8) for six physiological traits. p_ = plasticity of; Ψ_{pd} = predawn leaf water potential; D = radial growth of the main branch; L = longitudinal growth of the new branch; T = total leaf number variation; Ψ_{md} = midday leaf water potential; N = number of new leaves per branch.

Genotypes	p_Ψ_{pd}	p_D	p_L	p_T	p_Ψ_{md}	p_N
SPM-12	1.00 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.04
ERS-05	1.00 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.57 ± 0.09	0.33 ± 0.07
ALL-29	0.89 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.48 ± 0.08	0.19 ± 0.02	0.39 ± 0.07	0.43 ± 0.05
SPM-28	0.93 ± 0.01	0.42 ± 0.20	0.67 ± 0.19	0.38 ± 0.15	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.07
ERS-10	1.00 ± 0.01	0.44 ± 0.06	0.47 ± 0.07	0.30 ± 0.12	0.53 ± 0.01	0.39 ± 0.07
STR-16	1.00 ± 0.01	0.41 ± 0.15	0.41 ± 0.13	0.35 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.65 ± 0.13
SPM-40	0.89 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.60 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.39 ± 0.14	0.43 ± 0.12
RHN-38	0.96 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.45 ± 0.05	0.31 ± 0.08	0.52 ± 0.09	0.38 ± 0.04
BDG	0.91 ± 0.01	0.50 ± 0.13	0.57 ± 0.05	0.66 ± 0.14	0.15 ± 0.08	0.59 ± 0.09
RHN-35	1.00 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.55 ± 0.16	0.54 ± 0.10	0.59 ± 0.04	0.49 ± 0.04
72-501	1.00 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.47 ± 0.19	0.55 ± 0.16	0.48 ± 0.07	0.40 ± 0.09
STR-10	1.00 ± 0.01	0.52 ± 0.17	0.56 ± 0.04	0.46 ± 0.08	0.56 ± 0.02	0.43 ± 0.18
77-308	0.95 ± 0.01	0.57 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.23 ± 0.01
ERS-12	0.97 ± 0.01	0.45 ± 0.05	0.59 ± 0.24	0.91 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.50 ± 0.09

levels between genotypes (*e.g.* 0.13 < RDPI < 0.9 for p_T). The highest plastic trait to water deficit was p_Ψ_{pd} with RDPI from 0.89 to 1.0 (Table 3).

Black poplar genotypes developed different plasticity patterns to withstand a short-term severe water deficit (Fig. 5): ERS-05 was characterized by a high p_Ψ_{pd} and a low p_L/p_D contrary to BDG and SPM-40. Two genotypes (ERS-12 and RHN-35) were associated with high p_T in contrast with SPM-12, SPM-40 and ALL-29. In addition, the least plastic black poplar genotype (SPM-12, Table 3) was tolerant to severe water deficit, whereas the most plastic genotype (ERS-12) was avoidant. Earlier reports, of low plasticities of fitness-related traits (*i.e.* total biomass and tillering, Couso and Fernandez 2012), Ψ_{50} (Fichot *et al.,* 2010), water fluxes, gas exchange and antioxidant traits (Baquedano *et al.,* 2008) associated with drought tolerance, support this result. Differences in plasticity among genotypes could be partially explained by different selection pressure on traits occurring in their native environments (Valladares *et al.,* 2007). Plants adapted to a predictable environment and under low selection pressure, offer low plasticity in response to non-predictable water deficit because they are unable to adjust rapidly their physiological traits (Henry and Aarssen 1997, Valladares *et al.,* 2005, Ghalambor *et al.,* 2007, Willis *et al.,* 2008, Reed *et al.,* 2010). A low plasticity can be efficient to sustain primary metabolism (Valladares *et al.,* 2000). However, these plants take a risk: low plastic genotypes are usually close to their hydraulic safety margin and incur hydraulic failure (McDowell *et al.,* 2008). Conversely, species responding to water deficit by high plasticity could allocate resources to non-essential phenotypic modifications, which could be detrimental to their fitness (Alpert and Simms 2002, Steinger *et al.,* 2003). Parmesan and Hanley (2015) pointed out the complex impact of plasticity on plant performances under climate change which also depends on non-climatic constraints (*i.e.* interactions between species). Transplantation experiments suggested that their plasticity level depend on species (Willis *et al.,* 2008, Hargreaves *et al.,* 2014, Early and Sax 2014, Dalmaris *et al.,* 2015) and was not necessarily conditioned by climatic factors (Early and Sax 2014, Bradley *et al.,* 2015).

In our experiment, medium-to-high plasticity was concomitant to avoidance for 13 black poplar genotypes out of the 14 tested. Unexpectedly, the more plastic genotype was the more avoidant whereas the least plastic one was drought tolerant. Our results suggested that an avoidant strategy combined with a certain amount of response trait plasticity might reduce the plant performances for resources allocation and threatened poplar persistence in occasionally droughted environments. A better understanding of the molecular basis of the phenotypic plasticity could be approached by studying the relationships between phenotypic

plasticity and transcriptional responses of poplars subjected to drought, as recently shown by some authors (*i.e.* Cohen *et al.,* 2010, Hamanishi *et al.,* 2010, Hamanishi *et al.,* 2015, Viger *et al.,* 2016).

Author contributions

B.F. designed the study; F.G., B.F., P.B., P.C., R.S. performed the ecophysiological measurements; M.G.T. and B.F. performed the statistical analysis; P.L., A.G., C.B., J.S.V., D.L. and G.P. contributed to the interpretation of results; M.G.T., B.F., A.G. and P.L. wrote the manuscript, with the contribution of all authors.

Acknowledgements - The authors are indebted to the French national programme of conservation of genetic resources of *Populus nigra*, and especially Marc Villar (INRA Orléans, coordinator) and Olivier Forestier (ONF Guémené Penfao, in charge of vegetative reproduction and stoolbed management) for providing cuttings. Isotopic measurements were performed by the Functional Ecology Technical Platform (OC 081) at INRA's Forest Ecology and Ecophysiology station (UMR EEF 1137). We thank ATT Company for proofreading of this manuscript. We thank Pascaline Seguy, Cyril Chambon, Valentin Journe, and Alexandre Amblard for their help in trait measurements.

Supplementary data

Appendix Table S1. Branch growth traits of 14 well-watered (WW) and droughted (WS) black poplar genotypes subjected to 8-day water deficit. Mean (± SE) radial growth of the main branch (D), longitudinal growth of the new branch (L) and longitudinal growth of the new branch at the season‟s end (E) were presented here. Results of two-way ANOVA and HSD Tuckey‟s test were indicated by letters. Groups with the same letters were not significantly different. Crown dieback (ERS-12) or vegetation growth stops (SPM-28) = NA.

Genotype	Treatment	D (mm)		L (cm)		E (cm)	
		Mean (± SE)	HSD groups	Mean (± SE)	HSD groups	Mean (± SE)	HSD groups
SPM-12	WW	2.1 ± 0.4	abc	3.7 ± 3.0	Abcdef	63.6 ± 9.9	ab
	WS	1.2 ± 0.2	bcdef	4.5 ± 0.6	abcdef	44.8 ± 11.6	a
ERS-05	WW	1.7 ± 0.1	abcdef	8.1 ± 1.6	abcd	86.3 ± 10.1	ab
	WS	0.9 ± 0.1	cdef	4.6 ± 0.4	abcdef	67.9 ± 11.7	ab
ALL-29	WW	1.2 ± 0.4	bcdef	8.8 ± 1.5	abc	34.5 ± 22.4	ab
	WS	0.9 ± 0.1	cdef	3.0 ± 0.6	cdef	53.2 ± 19.8	ab
SPM-28	WW	1.8 ± 0.2	abcde	6.8 ± 0.6	abcde	59.5 ± 19.8	ab
	WS	0.8 ± 0.3	def	NA	f	55.4 ± 12.5	ab
ERS-10	WW	4.3 ± 2.6	abcdef	5.3 ± 1.0	abcdef	55.9 ± 20.8	ab
	WS	0.7 ± 0.1	ef	1.8 ± 0.3	ef	19.3 ± 12.6	ab
STR-16	WW	1.6 ± 0.1	abcdef	7.5 ± 0.4	abcde	71.9 ± 12.3	ab
	WS	0.8 ± 0.3	def	3.6 ± 1.3	abcdef	35.6 ± 13.8	ab
SPM-40	WW	1.6 ± 0.1	abcdef	9.9 ± 1.1	a	40.9 ± 13.5	ab
	WS	0.9 ± 0.1	cdef	2.4 ± 0.2	def	38.0 ± 13.9	ab
RHN-38	WW	2.0 ± 0.3	abcd	9.1 ± 1.0	ab	74.3 ± 5.6	ab
	WS	1.2 ± 0.1	bcdef	3.4 ± 0.5	abcdef	48.2 ± 15.2	ab
BDG	WW	1.5 ± 0.2	abcdef	10.4 ± 1.2	a	60.5 ± 13.7	ab
	WS	0.5 ± 0.2	f	2.8 ± 0.4	cdef	52.5 ± 19.2	ab
RHN-35	WW	2.3 ± 0.2	ab	9.6 ± 0.4	ab	62.6 ± 15.5	ab
	WS	0.9 ± 0.1	cdef	3.0 ± 1.3	cdef	37.7 ± 10.4	ab
72-501	WW	1.5 ± 0.1	abcdef	6.5 ± 0.7	abcde	59.2 ± 10.8	ab
	WS	1.1 ± 0.1	bcdef	3.4 ± 1.6	bcdef	47.6 ± 14.3	ab
STR-10	WW	2.5 ± 0.2	a	5.2 ± 0.7	abcdef	49.2 ± 11.9	ab
	WS	0.7 ± 0.5	ef	1.4 ± 0.2	ef	29.0 ± 10.8	b
77-308	WW	1.4 ± 0.1	abcdef	6.7 ± 0.8	abcde	81.2 ± 6.2	ab
	WS	0.4 ± 0.1	f	2.3 ± 0.1	def	31.1 ± 2.0	ab
ERS-12	WW	1.7 ± 0.6	abcdef	3.8 ± 1.5	abcdef	56.3 ± 18.3	ab
	WS	0.5 ± 0.2	ef	1.8 ± 1.7	abcdef	NA	ab

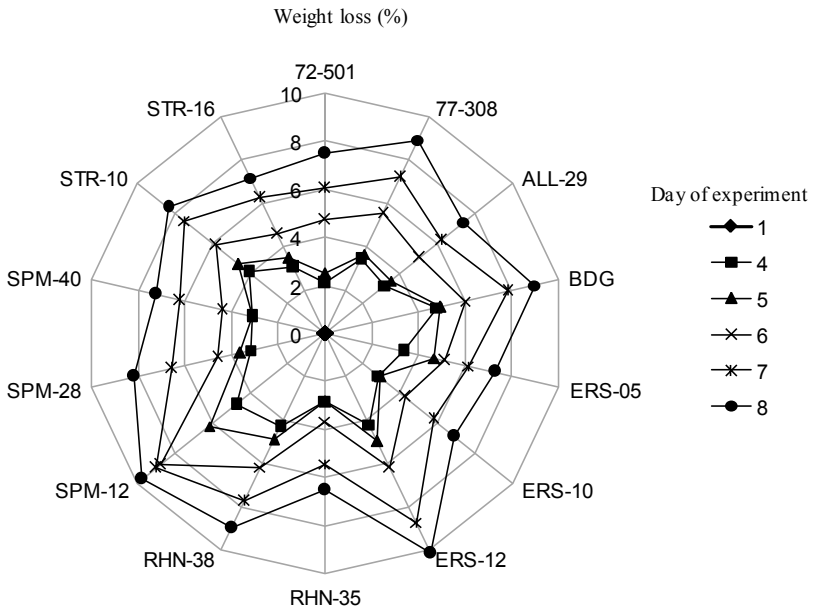
Appendix Table S2. Principal Component Analysis loadings of the six relative distance of plasticity index traits. Contribution and quality of the representation were detailed for each trait along the first three dimensions (1, 2, 3). p_ = plasticity of; Ψ_{pd} = predawn leaf water potential; Ψ_{md} = midday leaf water potential; D = main branch diameter gain; L = new branch length gain; T = total leaf number variation; N = number of new leaves per branch.

	Dimension					
	1		2		3	
Trait	Contribution	Quality	Contribution	Quality	Contribution	Quality
p_Ψ_{pd}	26.93	0.43	9.78	0.13	12.23	0.15
p_Ψ_{md}	19.96	0.32	18.42	0.24	7.39	0.09
p_D	3.20	0.05	3.68	0.05	58.44	0.72
p_L	28.93	0.46	6.30	0.08	1.98	0.02
p_T	1.55	0.02	47.35	0.63	11.03	0.14
p_N	19.43	0.31	14.48	0.19	8.94	0.11

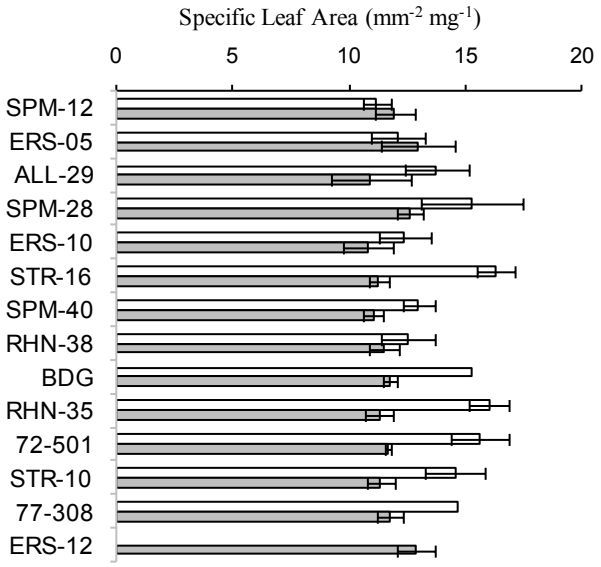
Appendix Table S3. Test of genotype effect on plasticity degree using Relative Distance of Plasticity Index estimated on physiological and growth traits of 14 black poplar genotypes at the maximal water

Description of physiological traits	*P-values* significance
Water movement traits	
Predawn leaf water potential (Ψ_{pd}, Mpa)	< 0.001*
Midday leaf water potential (Ψ_{md}, Mpa)	0.130
Growth and development traits	
Branch	
Main branch diameter gain (D, mm)	0.047*
New branch length gain (L, cm)	0.619
Leaf	
Total leaf number variation (T, %)	0.003*
Number of new leaves per branch (N)	0.157

.



Appendix Fig. S1. Mean percentage evolution of weight loss of 14 black poplars growing in pots subjected to progressive 8-day water deficit. Weight loss per pots reflected water loss by evapotranspiration.



Appendix Fig. 2. Mean (± SE) Specific Leaf Area of 14 well-watered (grey bars) and droughted (white bars) black poplar genotypes at the maximal water deficit (Day 8). A statistical effect of treatment on SLA was observed but no genotype effect was found using a two-way ANOVA.

Chapitre II

La plasticité des réponses phénotypiques et transcriptionnelles intégrées du peuplier noir à la sécheresse

Chapitre II :

Plasticité des réponses phénotypiques et transcriptionnelles intégrées du peuplier noir à la sécheresse

Cet article a été rédigé pour être soumis dans le journal *The Plant Journal*.

Contexte

Les plantes pérennes sont capables d"ajuster leurs traits phénotypiques selon une stratégie et un niveau de plasticité qui leur sont propres, en association avec la modification de leurs fonctions cellulaires. Un gradient de réponse et de plasticité phénotypique a été observé parmi les génotypes de peuplier répondant au déficit hydrique sévère (Chapitre I). Ceci suggère l"existence d"une pluralité d"ajustement des mécanismes de régulation qui peuvent être potentiellement exprimées et identifiées au travers des données –omiques.

L"étude du transcriptome foliaire global du peuplier noir en réponse à la sécheresse n"a encore jamais été réalisée. Cette étude propose de caractériser, dans un premier temps, la réponse transcriptomique globale de six génotypes de peuplier noir répondant à un stress hydrique sévère à l"échelle de l"organe foliaire et, dans un second temps, d"analyser les relations entre réponses physiologiques et transcriptomiques, et plasticités phénotypiques et transcriptionnelles, au regard des stratégies tolérante et évitante des génotypes.

Résultats

Comme observé dans l"étude précédente (Chapitre I), les réponses physiologiques, de croissance et de développement forment un continuum parmi les génotypes qui traduit une stratégie proche de l"évitement. En revanche, un génotype semble plus tolérant que les autres au travers du maintien de la croissance et du développement foliaire.

Près de 41% du transcriptome foliaire du peuplier noir est différentiellement exprimé en réponse à un déficit hydrique sévère. Les voies de signalisation fortement activées sont en lien avec la modification de la structure des membranes, le maintien de l"homéostasie cellulaire et la détoxication. Le transport intra- et extra-cellulaire, comprenant la régulation des aquaporines, des vésicules de transport et des syntaxines, semble un pilier des réponses à la déshydratation provoquée par la sécheresse.

Le degré de plasticité est calculé pour chaque transcrit et chaque génotype à l"aide de du Relative Distance of Plasticity Index. Au sein des six génotypes étudiés, un gradient de plasticité transcriptionnelle est observé parmi les génotypes. Ainsi, le génotype possédant la

plus faible plasticité transcriptionnelle moyenne est aussi le plus tolérant au déficit hydrique. Il existe une spécificité de régulation de la plasticité car 40% des transcrits les plus plastiques sont spécifiques des génotypes. Les transcrits les plus plastiques du génotype possédant la plus faible plasticité moyenne interviennent dans la fixation de carbone et le transport de messagers secondaires alors que ceux du génotype de plus forte plasticité font partie des voies de régulations génomique et transcriptionnelle, et de la sensibilité aux hormones. 80% des transcrits les moins plastiques sont également caractéristiques des génotypes. Les transcrits codant des aquaporines, des vésicules de transport et des syntaxines possèdent une plasticité spécifique au génotype, indiquant que la régulation de la plasticité des flux cellulaires dépendrait du génotype.

Les corrélations entre les plasticités des traits phénotypiques et du niveau d"expression des gènes sont identiques parmi les génotypes suggérant que les mécanismes de régulation de la plasticité seraient relativement conservés dans l"espèce. La plasticité de quelques transcrits est spécifiquement corrélée à celle de la conductance stomatique, de la croissance longitudinale et de la couverture de la nervure principale.

Conclusions

Comme attendu, le profond remodelage du transcriptome foliaire en cas de carence hydrique sévère tend à maintenir l"hydratation et l"intégrité des tissus foliaires grâce à la modulation de l"expression de gènes impliqués dans l"homéostasie cellulaire, la structure cellulaire et le transport intra-cellulaire. Ces modifications semblent communes aux génotypes ce qui n"est pas le cas de leur niveau de plasticité. La régulation du degré des plasticités transcriptionnelles et phénotypiques semblent dépendre du génotype.

Title: Black poplar response to drought: the role of transcriptional plasticity

Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont*, Romain De Oliveira, Pierrick Benoit, Benjamin Alary, Gilles Petel, Jean-Stéphane Venisse, Philippe Label

Authors' address:

Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

*Corresponding author (Aurelie.GOUSSET@uca.fr, +33 4 73 40 79 29)

Abstract

Trees are able to respond to drought by adjusting their general metabolism depending on their plasticity. Whereas phenotypic plasticity has been well studied, less attention has been paid to the plasticity of molecular gene expression. This study attempted (i) to explore the integrated phenotypic and transcriptional drought responses of black poplar, (ii) to quantify for the first time in a tree the plasticity of the whole transcriptional response to drought and (iii) to decipher the link between phenotypic and transcriptional plasticities and plant response strategies face to drought. Several contrasted two-year-old French black poplar genotypes were subjected to a progressive drought by withholding water until severe stress. Water fluxes, growth, development and leaf architecture were monitored during the experiment. Whole leaf blade transcriptome was analyzed at the severe drought stress stage. Plasticity for each plant response traits was calculated and analyzed together in accordance with plant response strategies. As observed in a previous study (Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017; in press), every genotype had a specific physiological and growth response to drought along a continuum between avoidant and tolerant strategy. Most of them were avoidant, characterized by a stop in carbon assimilation, growth and development and had mild to high plasticity. Only one was tolerant by maintaining its growth during drought and was associated with the lowest phenotypic trait plasticity. About 41.3% of the black poplar transcripts were differentially expressed in response to drought including 11,486 up-regulated and 14,731 down-regulated transcripts. These transcripts were linked to modifications of cellular functions such as drought signalling pathways, detoxification and cellular homeostasis maintaining. Important changes concerned cellular movements, membranes integrity and water fluxes regulations by aquaporins. A gradient of transcriptional plasticity appeared among genotypes highlighting that the most tolerant genotype possessed to lowest mean

transcriptional plasticity. Transcriptional plasticity of many biological processes was specific to genotypes as for example some syntaxins, PIP, TIP and NIP aquaporins. Plasticity of genes coding TIP2;1 and PIP1;2 aquaporins were especially correlated to stomatal conductance and carbon assimilation plasticities. Our results suggested that molecular regulation of plasticity was in part decoupled of the regulation of transcriptional expression level. Besides, we suspected that the Populus nigra species possesses an important acclimation capacity to cope with climate change thanks to the high degrees of phenotypic and transcriptional plasticities.

Key words: *Populus nigra*, drought, leaf transcriptome, phenotypic plasticity, transcriptional plasticity, aquaporins, SNARE

Introduction

Current drought increases (Beniston *et al.,* 2007; Burkett *et al.,* 2014) are expected to threaten distribution and survival of perennial plants (Bréda *et al.,* 2004; Parmesan and Hanley, 2015). In response to water depletion, successive hydraulic and metabolic changes are engaged to reduce water loss and avoid tissue damages. First of all, leaf transpiration is reduced by stomatal closure (Stalfelt, 1955; Tardieu and Simonneau, 1998; Marron *et al.,* 2002; Brodribb and Holbrook, 2003; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Araújo *et al.,* 2011) despite high evaporative demand. This constraint led to a decrease of all organs water potential (Tyree and Sperry, 1988; Sellin, 1999; Sack and Holbrook, 2006). Growth decreased then carbon assimilation, resulting on carbon dioxide and water fluxes decreases (Bray, 1997; Thomas and Eamus, 1999; Caruso *et al.,* 2002; Monclus *et al.,* 2006; Bonhomme *et al.,* 2008; Hamanishi *et al.,* 2012). Leaf abscission occurred during severe drought and was caused by cavitation events in veins (Tyree *et al.,* 1993). Chronology and intensity of phenotypic plant drought responses defined a strategy depending on species, genotypes and drought intensity. Two major strategies in response to drought have been identified. Drought tolerant species, as *Populus balsamifera* and *Populus simonii*, maintain growth and development (Isebrands and Richardson, 2014) supported by osmotic adjustments (Gebre *et al.,* 1994; Hanin *et al.,* 2011; Barchet *et al.,* 2013) and avoidant species, such as *Populus euphratica*, quickly close stomata, stop growth and promote early leaf senescence. *Populus nigra*, as hygrophilous species (Isebrands and Richardson, 2014) and tree model (Bradshaw *et al.,* 2000; Taylor, 2002), was particularly indicated to study drought responses owing to its vulnerability to water depletion (Bréda *et al.,* 2006). However, within species as *Populus nigra*, a drought response continuum has been observed from avoidant to tolerant strategies according to the genotypes considered (Cocozza *et al.,* 2010; Viger *et al.,* 2016; Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, in press). These observations suggested molecular adjustments of the drought responses.

Molecular analysis of higher plants subjected to drought revealed huge transcriptional modifications, as observed in poplar species (Street *et al.,* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Wilkins *et al.,* 2009; Cohen *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2015). They were under control of abscisic acid (ABA), defining the ABA-dependant pathway (Wang *et al.,* 2003; Tuteja, 2007). Cellular functioning is reconfigured by a complex stress signalling network (Golldack *et al.,* 2014; Singh and Laxmi, 2015), including transcriptional regulations (Joshi *et al.,* 2016), macromolecules stabilization, osmotic adjustments (Golldack *et al.,* 2014). Aquaporins, part of the Major Intrinsic Proteins, are transmembrane protein channels promoting small molecules movements into the transmembrane pathway (Preston *et al.,* 1992;

Maurel *et al.,* 1993; Chaumont *et al.,* 2000). Plasma membrane Intrinsic Protein (PIP) and Tonoplast Intrinsic Protein (TIP) are the more numerous aquaporins subfamilies (Maurel *et al.,* 2008). Both are anchored respectively in plasma and vacuolar membranes although Small Intrinsic Proteins (SIP) and Nodulin 26-like Intrisic Proteins (NIP) were mainly found into endoplasmic reticulum. The recently discovered X Intrinsic Proteins (XIP; Danielson and Johanson, 2008) were found anchored in plasma membrane facilitating boric acid (Ampah-Korsah *et al.,* 2016) and glycerol fluxes (Lopez *et al.,* 2016). Aquaporins were firstly studied for their ability to regulate water fluxes, especially interesting in drought response strategies. Furthermore, many rapports highlighted their key role in small molecule fluxes thanks to pore selectivity triggered by layout of sub-units in hetero- or homo-tetramers (Fetter, 2004). Little is known about their regulation at transcripts and genes levels. Many aquaporins isoforms such as *PIP1;2* could be under ABA control leading to their over-expression in drought-treated maize (Parent *et al.,* 2009). However, other isoforms were not sensitive to ABA concentration changes (Hachez *et al.,* 2014). PIP aquaporins activity was modulated by their internalization into vesicles leading to their sequestration, recycling or degradation (Törnroth-Horsefield *et al.,* 2010; Hachez *et al.,* 2013; Maurel *et al.,* 2015). Such retrograde pathway could be associated to anterograde pathway responsible of protein transport from endoplasmic reticulum to plasma membrane. Vesicular transports steps were under control of proteins that recognized specific aquaporins domains, such as syntaxins, vesicle-associated membrane proteins and proteins with domains favouring vesicle formation (Chaumont and Tyerman, 2014). Recently, it has been demonstrated that the syntaxin subfamily, called soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE), was required for vesicle fusion with plasma membrane (Peer, 2011). One suspected that "SNARE interacting with vesicular transport pathway (ko04130)" could modulate aquaporins activity under drought to support water and small molecules fluxes regulation. Until today, major drought transcriptional responses have been defined despite high variations in transcript abundance among species, genotypes and clones (Landry *et al.,* 2006; Wilkins *et al.,* 2009; Cormier *et al.,* 2010; Viger *et al.,* 2016). Authors suspected that such modulations in transcripts abundance could support phenotypic plasticity.

Phenotypic plasticity has been identified many decades ago and defined as all phenotypes produced by one genotype growing in fixed environmental conditions (Bradshaw, 1965; Sultan, 2000). Its level is dependent on species (Iogna *et al.,* 2013; McKown *et al.,* 2014), genotypes (Bizet *et al.,* 2014), measured trait (Couso and Fernandez, 2012) and environmental conditions. Plasticity could act as a regulation system buffering plant responses

to favor their persistence in fluctuating environments (Nicotra *et al.,* 2010). Two theories are commonly found in literature to explain the molecular basis of phenotypic plasticity (Thomas *et al.,* 2016). The first consideres genes as environmental signal sensors whose expression depends on the signal intensity and fixes phenotypic plasticity level. The second hypothesis describes two categories of genes influencing plasticity: genes regulating the expression level (as transcription factors) and those responsible of mean values of phenotype (as Quantitative Traits Loci). Nevertheless, both theories were agreed to court on the absolute necessity to consider phenotypic plasticity and molecular pathway regulations as key levers of species survival and evolution. Despite recent epigenetic and quantitative trait loci studies molecular mechanisms supported phenotypic plasticity were still not clear (Fabbrini *et al.,* 2012; Han and Wagner, 2014; Alsdurf *et al.,* 2016; Thomas *et al.,* 2016). Phenotypic plasticity of many *Populus nigra* genotypes subjected to drought was associated with high variations of transcripts abundance (Viger *et al.,* 2016). In our point of view, these findings referred to what we called transcriptional plasticity. Despite the crucial role of plasticity in plant responses to environmental changes, quantification of plasticity at transcriptome scale has never been engaged to our knowledge.

Our purpose was to quantify and compare the phenotypic and transcriptional responses plasticity of six young black poplar genotypes contrasted about their response to drought. Black poplar trees, contrasted for their French geographical origins, physiology and strategy response to drought (Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, in press), were subjected to a short progressive water deficit until severe drought. They were monitored for physiological, growth and anatomical traits, and were analyzed regarding to their whole leaf transcriptome at maximal level of stress. In addition of the study of drought responses strategies, molecular basis of phenotypic plasticity was explored with quantification of transcriptional plasticity. The expressions of aquaporins and SNARE interacting with vesicular transports were focused regarding to plasticity traits related to water fluxes.

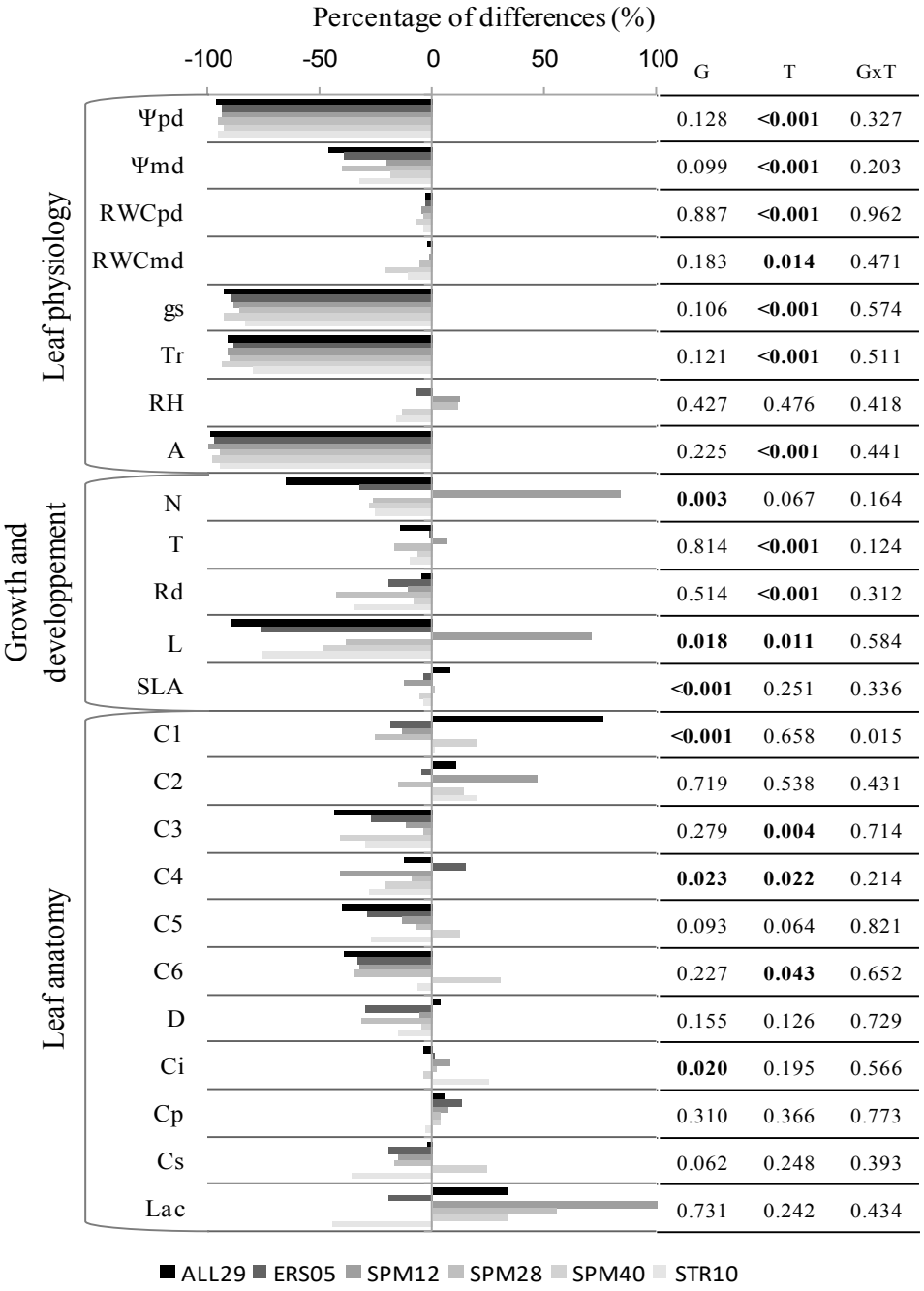


Figure 1. Percentage differences of leaf physiology, growth and development and leaf anatomy traits of six black poplar genotypes subjected to drought using the formula [(drought – well-watered)/(well-watered)] x 100 from Street *et al.* (2006). The results of two-way ANOVA are shown for each trait at the maximal drought stage D0 (significant *P*-values in bolt). ANOVA codes : T = Treatment; G = Genotype; GxT = Genotype by Treatment interaction. Ψ = leaf water potential; RWC = realtive water content; pd = predawn; md = midday; gs = stomatal conductance; Tr = transpiration; RH = relative humidity; A = net carbon assimilation; N = number of new leaves; T = total leaf number variation; Rd and L = radial and longitudinal growth of the new branch; SLA = specific leaf area; C1 to C6 = veins covering from order 1 to 6; D = stomatal density; Cs, Cp and Ci = covering of spongy parenchyma, palissadic parenchyma and intermediate layer; Lac = covering of lacuna.

Materials and methods

Plant material and experimental design

Six French black poplar (*Populus nigra*) genotypes (ALL29, ERS05, SPM12, SPM28, SPM40 and STR10) provided by the national collection of Guéméné-Penfao (UR 0588 AGPF and UE GBFOR at the INRA‟s Val-de-Loire station) were used. They were selected according to their geographical origin, contrasted drought responses, and phenotypic plasticity (see Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017 in press). Eight clonal trees per genotypes were grown from unrooted 30 cm cuttings in 25 L pots (⅓ black peat and ⅔ local Limagne topsoil) in the common garden of Université Clermont Auvergne from Clermont-Ferrand (45.76 N, 3.12 E). Trees were 1.5 m spaced, fully randomized and bordered by remaining black poplar clones from the different genotypes in order to avoid border effects. Automatic irrigation delivered 2 L per day and per two-years-old tree (769 ± 36 leaves). Four clones per genotypes were subjected to withholding water until they reached a predawn leaf water potential of -2 MPa corresponding to severe drought for this species (Marron *et al.,* 2003; Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, in press). Time duration of the water deficit experiment varied among genotypes from 8 days for STR-10 to 11 days for SPM-28. Then, water deficit was stopped by rewatering according to water control delivery. The other four control clones were well-watered (2 L/day). Water deficit was checked by weighting the pots (Supplementary Figure 1). Rehydration by dew or rain of droughted trees was prevented by covering pots with plastic bag.

Water movements

Hydraulic tree status was daily monitored on rank-five leaves by measuring predawn and midday leaf water potential (Ψ_{pd} and Ψ_{md} in MPa) from 0400 to 0500 a.m. (before sunrise) and from 1230 to 1300 p.m. respectively using a Scholander pressure chamber (Model 600, PMS Instrument Company, USA).

Leaf gas exchange was daily measured from 1100 to 1200 a.m. from a five-rank leaf. Stomatal conductance (gs, mmol m^{-2} s^{-1}), leaf Transpiration (Tr, µg cm^{-2} s^{-1}) and Relative Humidity (RH, %) were measured using a LI-1600 Steady State Porometer (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

Fresh leaves used for Ψ measurements were weighted before and after four hours of rehydration in distilled water to obtain respectively fresh Weight (W, mg) and Turgid Weight

(TW, mg). Sample Dry Weight (DW, mg) was measured after four days of drying at 60°C. Predawn and midday Relative Water Content (RWC, %) were estimated as: RWC = [(W-DW) / (TW-DW)] x 100 (Weatherley, 1970).

Net carbon assimilation (A, µmol m^{-2} s^{-1}) and stomatal conductance (gs_i) were measured daily on rank-five leaf using a LI-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) with fixed parameters (Photosynthetically Active Radiation = 1500 µmol m^{-2} s^{-1}, [CO_2] = 350 µmol mol^{-1}).

Plant growth and development

Sylleptic and proleptic branching determine poplar architecture (Hallé *et al.,* 1978; Ceulemans *et al.,* 1990; Wu and Hinckley, 2001). At the beginning of the experiment, apical buds of the proleptic shoots (named new branches) emerging from the longest older sylleptic branch (named main branch) were marked to identify leaves which grown during the experiment. Main branch diameter and new branch length were measured between the first and the last day of the experiment to estimate radial (Rd, mm) and longitudinal (L, cm) growths respectively.

The number of new leaves produced during the drought experiment (N) was counted. The evolution of total tree leaves number (Bm, %) has been calculated by counting them before and after the drought.

Leaf samples, used for RWC measurements, were scanned and leaf area (A_r, mm²) was obtained after image analysis using ImageJ software (Schneider *et al.,* 2012; version 1.48). Specific Leaf Area (SLA, mm^{-2} mg^{-1}) was then calculated as: SLA = A_r / DW.

Leaf anatomy

Leaf vein architecture was studied on one rank-four leaf per tree produced during the drought period was sampled after the rewatering day. Fresh leaves stained with 0.5% toluidine blue for 30 seconds after cleaning using 1M KOH solution under stirring were scanned. Then they were photographed under light microscope. Pictures were analysed using ImageJ software to compute all one to six order veins length (L_i, mm) and width (W_i, mm) relative to specific area (A_i). Each vein covering related to leaf area (C, %) was calculated as:

$C = (\sum L_i W_i) / A_i$.

The same samples were used to estimate above leaf stomatal density on abaxial surface (D, number mm^{-2}):

$D = N_{stom} / A_{stom}$

where N_{stom} is the stomatal number measured on three surfaces of the leaf and A_{stom} the total measured leaf area equal to 1.2 mm².

Leaf vein structure was studied on one new rank-four leaves per tree, developed during drought experiment and sampled after rewatering. Five cuttings along leaf midrib (the longest and thickest vein) were fixed in Formaldehyde Acid Acetic (FAA). Infiltration was improved by vacuum chamber during 30 min at 4°C. Cuttings were stored 8 h in FAA then dehydrated by ethanol baths of increasing concentrations. Samples were immersed in pure ethanol during 8 h at 4°C. Tissues were gradually infiltrated with LR-White resin at 4°C. The last pure resin bath was renewed two times for 8 h at 4°C. Cuttings enclosed in capsules with pure resin and dried 24 h at 55°C (Ayer-Le Lièvre, 1992).

Cross sections of 2 µm width were obtained with microtome and observed using an optical microscope ZEISS Axioplan 2 with AxioCamHRc camera. Pictures were combined using MosaicJ plugin (Thévenaz and Unser, 2007) on ImageJ software. Palissadic parenchyma (Cp, %), spongy parenchyma (Cs, %), intermediate layers (Ci, %) and lacuna (Lac, %) covering were calculated related to cross section area (A_{sec}, mm²) as: $C = S_x / A_{sec}$ where S_x is tissue or lacuna surfaces manually measured.

RNA extraction and sequencing

Three rank-four leaf blades (without midrib and petiole) per tree were sampled when trees reached Ψ_{pd} = -2 MPa at midday and mixed together for RNA extraction (Wilkins *et al.,* 2009). Total RNA was extracted using an organic extraction method with ten cleaning phases (chloroform/isoamylic acid and ethanol; Chang *et al.,* 1993). Concentration of RNA extracted from droughted and well watered trees were not significantly different among genotypes ($0.11 < P < 0.36$). RNA integrity and purity were verified with Nanodrop bioanalyzer (2 µg, 200 ng L^{-1}, RIN > 8). RNA sequencing was performed by GATC platform service (Konstanz, Germany) following standard Illumina procedure for library preparation and multiplex sequencing. Whole RNA were randomly fragmented, then inserted in libraries and sequenced using Illumina HiSeq 2000 to obtain 2 x 101 bp paired-end reads. On average, 14,778,636 paired-end reads were obtained over 48 samples for a total of 1,389,191,810 raw short reads produced by GATC platform. The per-sample paired-end reads and power detection were given in Supplementary Table 2.

Cleaning of raw short reads

On a per-short read basis, all sequences were filtered using a high throughput data treatment procedure implemented on Genotoul parallel calculation cluster facility (INRA-Toulouse, France). In brief, short reads were filtered according ordered following criteria: vector/primers were removed using TagCleaner 0.16 program (Schmieder *et al.,* 2010); anonymous nucleotides (N) were discarded, keeping information only from the longest N-free sequence; poly-A were removed from short read ends; short reads less than 60 bp were discarded (< 1%); short reads with low complexity, based on above 30% Lempel-Ziv-Welch (Welch, 1984) compressibility, were filtered out; short reads purportedly originating from contaminating sequences (SeqTrimNext; Falgueras *et al.,* 2010) were discarded (< 3%); and finally short reads were reappaired for subsequent mapping. In average, 7% (from 1% to 17% per tree) of paired-end short reads were removed from raw data (Supplementary Table 2). Mapping on the 73,013 reference transcripts from *Populus trichocarpa* transcriptome (Tuskan *et al.,* 2004) was performed using BWA 0.7.12 program (Li and Durbin, 2010), parameterized with a maximum of 1% divergence. On average, 83% (from 72% to 88% per tree) of cleaned paired-end short reads mapped onto poplar reference transcriptome and 78% (from 61% to 87% per tree) of the reads were used in the transcriptome analysis.

Internal transcriptome control using aquaporin genes expression

Three Plasma membrane Intrinsic Proteins (*PIP2;4*, *PIP2;7* and *PIP2;10*), known to be differentially expressed in leaves in response to drought, were used as positive control to validate the transcriptome analysis. The expression of these genes was quantified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Reverse transcription of the same total RNA samples (0.5 µg μL^{-1}) was done using SuperScript^{TM} III First-Strand Synthesis System kit (Thermo Fisher). PCR samples contained 2 µL of 1/40 diluted cDNA were added to 7.5 µL of MasterMix (MESA GREEN qPCR kit, Eurogentec), 0.6 µL of forward and reverse primers (Supplementary Table 3) and completed to 15 µL with distilled water. qRT-PCR was started with an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of amplification: 10 sec at 95°C, 15 sec at 56°C and 15 sec at 72°C. The geometric average and the stability of two reference genes (*Act1* and *TIP41*) threshold cycles (Ct) was calculated with BestKeeper tool (Pfaffl *et al.,* 2004). Relative gene expression was normalized by this new reference using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Pfaffl, 2004). Gene expression levels were compared to log2 Fold Change (Supplementary Figure 2). Table containing gene name associated to transcript identifier

(*Populus trichocarpa* v3) of targeted Differentially Expressed Genes (DEG) was joined as Supplementary Table 4.

Differential expression analysis of transcripts

Results of mapping counts per transcript and per sample were tested for detection of DEG using the DESeq2 package (Love *et al.,* 2014), version 1.10.1 in the R environment (R core Team 2016, version 3.3). The statistical model combined genotype (ALL29, ERS05, SPM12, SPM28, SPM40, STR10), treatment (drought, well-watered), and their interaction. A Variance Stabilizing Transformation (VST) was applied on mapping counts to normalize their distribution. A Principal Component Analysis (PCA) was performed using FactoMineR package (Lê *et al.,* 2008, Husson *et al.,* 2016; version 1.32) on all samples and all transcripts using VST counts. The power of detection of differentially expressed transcripts during drought estimated per genotype using Scotty (Busby *et al.,* 2013) was excellent to further analyse (Supplementary Table 5). Differential transcript calling by DESeq2 was controlled at a False Discovery Rate (FDR; Benjamini and Hochberg, 1995) of 10^{-4}, limiting the probability to no more than one false-positive gene per up- or down-regulated gene list.

Annotation inference of poplar transcripts and GO assignation

Original 73,013 poplar transcripts from reference poplar genome database (Phytozome, (Goodstein *et al.,* 2012) version 3) were re-annotated using Blast2GO (Gotz *et al.,* 2008, version 3.1.3) parameterized as following: BLASTp performed against NCBI non-redundant database using QBlast-NCBI server with BLAST E-value $<10^{-3}$; word size of 3; low complexity filter enabled and HSP length cutoff set at 33. A full InterProScan analysis was then performed along with a Gene Ontology (GO) terms mapping with GO weight of 5 or more and an E-value hit filter set at $<10^{-6}$.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

GSEA allows identification of biological clues related to treatment effects on sample. The method is based on genes list sorted by their differential expression level. Extreme gene sets are extracted and compared to a reference list to determine whether genes are over- or under-represented in the studied list. Chi-square is used to compare observed and expected abundances of transcripts and *P*-values are adjusted with a Benjamini-Yekutieli correction (FDR = 0.01; Benjamini and Yekutieli, 2001). REVIGO software (Supek *et al.,* 2011) was used to estimate relative proportion of non-redundant functional categories.

Global physiological and transcriptional statistical analysis

Statistical analyses were performed using R environment (R core Team 2016, version 3.3) with $\alpha = 0.05$. The effect of progressive drought over time on weight loss, Ψpd, Ψmd, gs, Tr, RH, RWCpd, RWCmd and A were analysed using two-way ANOVA with repeated measures and pairwise contrast.

Transcriptional plasticity was quantified on high-quality transcripts using Relative Distance Plasticity Index (RDPI; Valladares *et al.,* 2006) on VST counts. RDPI was calculated per individual j from VST counts of a transcript xij in well-watered (control) and drought (stress) treatment i. The absolute difference between all pairs n was calculated to estimate plasticity as: RDPI = Σ (|xij – xi‟j‟| / (xij + xi‟j‟)) / n. Multivariate analysis using Principal Component Analysis (PCA) were performed on VST counts, RDPI values and Log2 Fold Change to identify correlations between variables. Quality of representation (cos^2) was noted in Table 2.

One-way ANOVA test and contrast analysis using post-Hoc Tuckey‟s test were performed to analyse the transcriptional plasticity values among genotypes. Transcripts were sorted according to RDPI values, then transcripts belonging to the first and the third quartiles were assigned respectively to high and poor plasticity. Functional categories of each transcripts group were identified by GSEA.

Phenotypic plasticities and transcriptional plasticities were analyzed together thanks to regularized Canonical Correlation Analysis from MixOmics package (Le Cao *et al.,* 2009, version 5.2.0). The method included two distinct multivariate analyses of the both data sets and normalization by the square root of the highest eigenvalue related to each data set to preserve group structure. Data sets were represented on the same factorial plan. Crossed correlations between physiological, growth, anatomical traits and transcripts were calculated to build a correlation network. Correlations between aquaporins expression and macroscopic traits were targeted to highlight interesting macroscopic traits responding to drought, explore whole leaf transcriptome and transcriptional plasticity.

Results and Discussion

Drought strategies were specific to black poplar genotypes

Physiological responses of the six genotypes subjected to water deficit were monitored over time (Supplementary Figure 1). Predawn leaf water potential (Ψ_{pd}) was used to estimate water status of trees during water deficit experiment as observed in other studies (Bray, 1997;

Marron *et al.,* 2003; Cocozza *et al.,* 2010). As expected, droughted genotypes reached -2.03 ± 0.11 MPa in around ten days which is considered as severe drought for many authors (Marron *et al.,* 2003; Cocozza *et al.,* 2010; Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010; Barchet *et al.,* 2013). Kinetics of other traits were normalized on time according to Ψ_{pd} values whose the day of the minimum value, called D0, referred to the maximum level of drought applied. No significant difference of physiological responses was found between genotypes along the water deficit ($P > 0.05$). However, the water treatment changed significantly the kinetic of leaf water potentials (Ψ_{pd} and Ψ_{md}; $P < 0.001$), the weight loss of pots ($P < 0.001$), the stomatal conductance (gs; $P < 0.001$), the transpiration (Tr; $P < 0.001$), the Relative Humidity (RH; $P < 0.001$), the predawn Relative Water Content (RWCpd; $P = 0.004$) and the net carbon assimilation (A; $P < 0.001$). Water loss by evapotranspiration among droughted trees was regular over time (-2.7% ± 0.3 per day) until reaching -23.6% ± 1.7 at D0. Droughted *Populus nigra* genotypes firstly reduced gs from D-8 to D0 which could explain the significant decrease of transpiration (Tr) at D-5 ($P = 0.001$). The decline of gs and Tr depicted typicall drought responses as observed in other studies (Tardieu and Simonneau, 1998; Marron *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007). Then, the decrease of A from D-5 ($P = 0.03$) could be explained by the decline of gas exchanges and the transpiration rate (Thomas and Eamus 1999, Lambers *et al.,* 2008, Hamanishi *et al.,* 2012). As expected, soil water deficit led to a progressive increase of the water column tension detectable through Ψ_{pd} at D-4. Predawn relative water content of leaves (RWCpd) significantly decreased during drought since D-2, indicating a water loss. In our experiment, Ψ_{md} responded later at D-1, as also observed in droughted poplar and willow (Johnson *et al.,* 2002; Barchet *et al.,* 2013). The whole physiological responses indicate that genotypes were subjected to severe drought stress at D0 and that leaves were under water fluxes regulations. In this way, we focused on this last day of the experiment to explore the plasticity of phenotypic and transcriptional responses.

The pattern of leaf physiology regulations was similar among genotypes by strongly reducing gs, Tr, Ψ_{pd}, Ψ_{md}, RWCpd and A (Figure 1). However, a genotype effect was observed ($P < 0.05$) for new leaf production (N), Specific Leaf Area (SLA) and longitudinal growth (L). Mature leaves of droughted SPM12 genotype did not suffer of precocious abscission contrary to the other genotypes. In addition, this genotype maintained growth and leaf development under drought. These results were in accordance with our previous study (Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, in press) showing SPM12 as the more drought tolerant genotype among the six‟s tested, although the five others were avoidant to water deficit especially ALL29. Similar observations regarding to leaf growth and development were made

Table 1. The most differentially expressed genes considering all black poplar genotypes subjected to severe drought (D0). Transcripts were characterized by absolute value of Log2FC upper 2.0 and counts number upper 5,000. Transcript identifiers referred to *Populus trichocarpa* annotation v3. Significance of fold change between well-watered and droughted samples was indicated by *P*-value adjusted using False Discovery Rate.

Differential expresion	Transcript identifier	Annotation	Fold Change (Log2)	*P*-value adjusted
Up-regulation	Potri.T111300.1	LEA protein	10.07	3.15E-151
	Potri.001G404100.1	NAC domain-containing protein	9.52	1.59E-134
	Potri.013G101000.1	Bark Storage Protein	9.11	3.78E-72
	Potri.014G116800.1	Galactinol synthase	5.74	1.19E-54
	Potri.011G118900.1	Metallothionein-like protein	5.25	1.53E-51
	Potri.014G103000.1	Homeodomain leucine zipper family protein	5.25	9.65E-123
	Potri.005G195700.1	Peroxidase	2.66	1.47E-42
	Potri.008G065600.6	Aquaporin PIP1;2	2.28	5.00E-41
Down-regulation	Potri.004G155400.3	MYB family transcription factor family protein	-10.00	5.31E-203
	Potri.019G024600.1	GDSL esterase lipase	-9.58	4.30E-34
	Potri.006G142600.1	Auxin-Binding Protein	-9.51	2.48E-78
	Potri.006G141400.1	flavonoid 3-monooxygenase-like	-9.31	5.67E-59
	Potri.004G015300.2	Peroxidase	-4.37	6.46E-24
	Potri.009G030800.3	Metallothionein-like protein	-3.57	3.14E-71

on poplar hybrids (Marron *et al.,* 2003; Larcheveque *et al.,* 2011) and black poplars (Regier *et al.,* 2009; Viger *et al.,* 2016) subjected to drought, suggesting leaf adaption to drought events. Furthermore, anatomy of leaves growing during the water deficit changed by reducing significantly C3, C4 and C6 covering (Figure 1). No significant differences were observed for stomatal density (D) and the covering of parenchyma (Ci, Cp, Cs) and lacuna (Lac) depending on the water treatment. In addition, whatever the water conditions, the covering of midrib (C1) was significantly the highest for ALL29, SPM12 and SPM40 compared to ERS05. These results suggested that progressive water deficit reduced carbon allocation in leaf venation in all genotypes for veins order upon 3. We suspected that change in leaf venation could reduce the mesophyll conductance to water and limit water loss by transpiration. Leaf water intake was maintained by midrib covering in ALL29, SPM12 and SPM40 under our drought conditions thereby improving leaf hydration (Sack and Holbrook, 2006; Scoffoni *et al.,* 2011). Sack *et al.,* (2012) showed that major veins density could be predefined in buds since no modifications occurred due to climatic conditions, as observed in our experiment for the unchanged covering of midrib and veins order 2. Leaves growing during the progressive water deficit seemed to support physiological regulations in part through their anatomy. Phenotypic responses showed a relative plasticity among genotypes which was explored with leaf transcriptome under drought.

Leaf transcriptome was remodelled under drought

Cleaning and mapping steps allowed the identification of 63,125 transcripts in black poplar compared to 73,013 transcripts found in *Populus trichocarpa* transcriptome (Supplementary Table 1). From 5 transcripts for STR10 to 126 transcripts for SPM40 were up-regulated in droughted trees, and from 3 transcripts for ERS05 to 45 transcripts for ALL29 were significantly repressed. Results concerning all genotypes were more robust compared to those focused on each genotype. Regarding all genotypes, 41.3% of transcripts were differentially expressed in leaves formed under water stressed conditions with 11,486 up-regulated and 14,731 down-regulated transcripts (Supplementary Table 1). It suggests that severe drought triggered major cellular functioning modifications in black poplar, as supported by leaf transcriptional variations detected in other droughted black poplar genotypes (Viger *et al.,* 2016) and in *Populus deltoides x nigra* hybrid for moderate water stress (Cohen *et al.,* 2010).

The most differentially expressed genes observed in droughted trees were related to signal transduction, cellular functioning and abscisic acid (ABA) pathway that is crucial in

drought signalling pathway (Table 1). Many of them constitute robust drought markers owing to their recurrent induction or repression under drought treatments and have been previously observed related to drought (Singh and Laxmi, 2015; Golldack *et al.,* 2014). Drought signalling was well-represented by significant differentially expressed transcription factors: NAC, homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) and MYB. These three genes families were under the control of ABA-dependant pathway in response to drought (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Elhiti and Stasolla, 2009; Golldack *et al.,* 2014). NAC factors could play the role of hub for transcriptional regulations (Singh and Laxmi, 2015; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006) of Reactive Oxygen Species (ROS) signalling leading to leaf senescence (Golldack *et al.,* 2014), phytohormone signalling and drought tolerance (Tran *et al.,* 2006). The large MYB family encompasses both down-regulated and up-regulated transcripts, as shown in *Arabidopsis* submitted to drought (Katiyar *et al.,* 2012). They were responsible of stomatal movement regulation, suberin and cuticular synthesis, leaf and root growth and development (Baldoni *et al.,* 2015).

Transcripts coding Late Embryogenesis Abundant (LEA) were mainly accumulated (around 78% of LEA annotated transcripts; Table 1). They could favour macromolecules stabilization and avoid their degradation under drought as observed in poplar species (Caruso *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Bae *et al.,* 2009), wheat (Brini *et al.,* 2010) and grass (Wang *et al.,* 2003; Meyer *et al.,* 2014; Swarbreck *et al.,* 2011). ROS, considered as early drought signals, must be rapidly scavenged to avoid cellular damages thanks to peroxidase (Cao *et al.,* 2013) or flavonoids (Cohen *et al.,* 2010; Wang *et al.,* 2016). Genes coding peroxidase bring to multigenic family which are specifically regulated depending on environmental conditions (Table 1). Cellular homeostasis and detoxification were preserved by accumulation of Bark Storage Proteins (BSP) being an available nitrogen pool, as shown in many poplar species (Plomion *et al.,* 2006), galactinol synthase (Nishizawa *et al.,* 2008; Cohen *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2015; Yoon *et al.,* 2014) and metallothionein (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Kohler *et al.,* 2004; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Xue *et al.,* 2008; Cohen *et al.,* 2010; Berta *et al.,* 2010). The growth decrease of droughted trees observed in our experiment could partially be supported by a repression of genes coding Auxin-Binding Proteins and GDSL (a consensus amino acid sequence of Glycine, Asparagine, Serine and Leucine) esterases lipases involved in development, growth and cellular elongation (Baldo *et al.,* 2010; Ranocha *et al.,* 2013), morphogenesis (Akoh *et al.,* 2004) and drought signal transduction (Ohmiya *et al.,* 1998; Singh Gujjar *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2016). Transcripts coding PIP1;2, commonly associated to water and small molecules regulations (Maurel *et al.,*

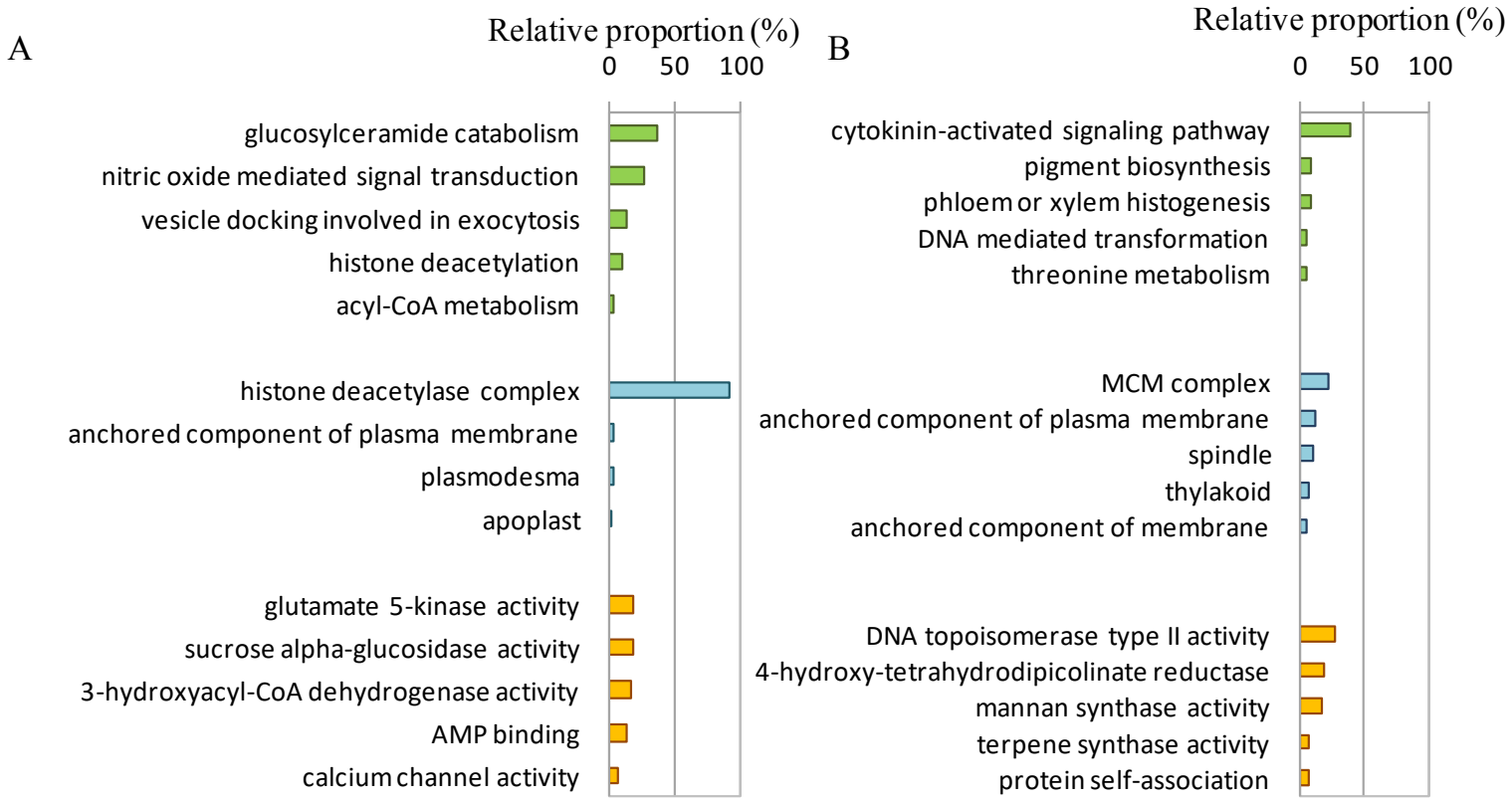


Figure 2. The five most represented functional categories among Differentially Expressed Genes found in black poplar leaf blade under drought. Relative proportion of over-represented Gene Ontology was estimated for (A) up-regulated and (B) down-regulated transcripts among the whole black poplar genotypes subjected to severe drought (D0). Biological process (green bars), cellular component (blue bars) and molecular function (orange bars) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels.

2008), part of the most over-expressed genes under our drought conditions. As aquaporins are known to be differentially expressed under drought (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Shatil-Cohen *et al.,* 2011; Cao *et al.,* 2013), a particular focus has been brought on them, giving more details on their role in water and small molecules regulations under reversible drought.

Membrane properties, trafficking and cellular homeostasis were highly regulated in drought conditions

Functional characterization of Differentially Expressed Genes (DEG) was realized considering all genotypes. Gene Set Enrichment Analysis fixed significantly over-represented non-redundant functions among up- and down-regulated genes. Degradation of glucosylceramide (GO:0006680) in leaves of drought-treated trees was particularly activated (Figure 2A). These molecules, also called cerebrosides, referred to sphingolipids sub-family anchored in plasma membrane (GO:0046658) and are known to interact with extracellular components modifying biochemical and physical properties of membranes (Lynch and Steponkus, 1987; Warnecke and Heinz, 2003). Some rearrangements, through the nature of lipids or quantity of each membrane component category, favoured cohesion between anchored elements of membranes and cell wall (Lynch and Steponkus, 1987; Ng and Hetherington, 2001; Pata *et al.,* 2010) but can be deleterious under prolonged exposure to dehydration by inducing hexagonal II phase (Jouhet, 2013). This was supported by high intra- and extra-cellular trafficking especially by exocytosis (GO:0006904), suggesting the supply of new or recycled components to the plasma membrane or apoplast (GO:0048046; Battey, 1999; Paez Valencia *et al.,* 2016). Study of molecular water stress response on different plant species including poplars did not mention such intensity levels of trafficking (Clauw *et al.,* 2015). Proteins trafficking and exocytosis appeared crucial for endomembrane system stability and water fluxes regulations under drought conditions but is in our knowledge poorly-documented. Particular attention has been paid to sub-family genes involved in vesicular trafficking leading to exocytosis (ko04130) to study water regulations in our drought conditions. Signal transduction involving nitric oxide was dominant in our experiment (GO:0007263) and secondary compounds from Reactive Nitrogen Species (RNS) initiated by mitochondria (Gupta *et al.,* 2011; Vanlerberghe, 2013). Nitric oxide is involved in ABA-dependant stomatal closure (Neill *et al.,* 2008) and stimulates production of anti-oxidant enzymes leading to ROS scavenging in maize leaves under water stress (Sang *et al.,* 2008). In addition, calcium channel activity (GO:0005262) was stimulated under drought suggesting

that this secondary messenger activated numerous extra- and intra-cellular pathways (Zhu, 2002; Conde *et al.,* 2011; Nick, 2013).

The over-representation of histone deacetylation function (GO:0016575) could suggest numerous epigenetic modifications responsible of transcription repression (Zentner and Henikoff, 2013; Chinnusamy and Zhu, 2009). Histone deacetylase (GO:0000118) belonging to ABA-pathway favoured stomatal adjustments in *Arabidopsis thaliana* subjected to drought (Sridha and Wu, 2006). Similar deacetylation intensity was not shown in previous study and could be explained by the level of drought which influenced the transcriptional abundance of histone deacetylase (Kim *et al.,* 2008; Gourcilleau *et al.,* 2010). Acyl-CoA metabolism (GO:0006637) was an activated biological process especially within acyl-CoA binding protein (ACBP). These molecules were expected to promote ABA signalling under drought (Du *et al.,* 2013) regulating stress responses, plant development, vesicular trafficking and membrane biosynthesis (Xiao and Chye, 2011).

The two enzymes categories most differentially expressed under drought were involved in osmotic adjustment. Glutamate 5-kinase (GO:0004349) is involved in proline biosynthesis (Singh Gujjar *et al.,* 2014) and is accumulated in Angiosperms responding to drought (Choudhary *et al.,* 2005; Cocozza *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2011; Liu *et al.,* 2015; Hamanishi *et al.,* 2015). This protein is suspected to maintain cellular homeostasis and to favour ROS scavenging (Szabados and Savouré, 2010). The high activity of sucrose alpha-glucosidase (GO:0004575) supports the degradation of sucrose under our drought conditions releasing fructose and glucose (Chiba, 1997). Su *et al.,* (2011) and Zhang *et al.,* (2014) showed that transgenic drought tolerant *Populus euramericana* exhibited fructose accumulation thereby suggesting that products from sucrose hydrolysis were implicated in cellular homeostasis, secondary metabolites synthesis and drought tolerance (Rosa *et al.,* 2009). Beta-oxidation of fatty acid by dehydrogenase (GO:0003857) and AMP-binding activity (GO:0016208) were particularly activated in our droughted poplars, as also observed in grass (Meyer *et al.,* 2014) and sorghum (Fracasso *et al.,* 2016). These activities were involved in carbon and energy supply and participated to fatty acid turnover of membrane lipids (Poirier *et al.,* 2006; Zhu and Xiong, 2013).

Down-regulated transcripts were associated to cytokinin metabolism (GO:0009736; Figure 2B) implying an increase of cell membrane integrity and ABA sensitivity, a decrease of developmental processes and leaf senescence signalling (Hwang *et al.,* 2012; Griffiths *et al.,* 2014). These two last responses were effectively observed among our genotypes except in SPM12 genotype. The decrease of photosynthesis we measured can be related to the reduction

of pigments biosynthesis (GO:0046148) in thylakoids (GO:0009579) and numerous biological processes referring to carbon assimilation (GO:0009765, GO:0015979, GO:0009825 and GO:0009058). In addition, vascular system histogenesis (GO:0010087) was reduced as mannan synthase activity (GO:0051753). This enzyme belongs to the cellulose synthase gene family producing mannan polysaccharides (He *et al.,* 2015) involved in lignin synthesis of xylem vessels in *Populus trichocarpa* (Suzuki *et al.,* 2006). The observed decline of leaf veins covering (Figure 1), is in agreement with recent findings on the reduction of vein density in *Toona ciliate* leaves acclimated to low humidity (Carins Murphy *et al.,* 2014). Such modifications could reduce leaf hydraulic conductance and leaf transpiration. Inhibitions of cellular division and expansion caused leaf growth limitation in maize under drought (Avramova *et al.,* 2015). This last observation was supported by our results: repressed genes encoding Mini-Chromosome Maintenance (MCM) proteins (GO:0042555) were involved in cell cycle regulation (Tuteja *et al.,* 2011). In addition, we found that many enzymes implied in DNA replication (GO:0003918), as DNA topoisomerase, were down-regulated. This suggested that DNA replication and mitosis were inhibited in our drought conditions limiting leaf growth. A decline in transcripts coding for threonine metabolism (GO:0006566) was detected in our droughted black poplars. This result was in agreement with the decrease of threonine abundance in droughted *Populus balsamifera* genotypes (Hamanishi *et al.,* 2015). Threonine is a precursor of isoleucine commonly accumulated during drought (Joshi *et al.,* 2010), but the abundance of the both varied independently in drought-treated poplar species (Hamanishi *et al.,* 2015) suggesting that threonine is involved in other processes. Enzymes, as 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase, involved in lysine biosynthesis pathway and secondary metabolisms (GO:0008839; Azevedo and Lea, 2001) were particularly down-regulated, as observed in *Populus simonii* subjected to drought (Chen *et al.,* 2013). The decrease of lysine biosynthesis was concomitant with the previous decline in threonine because the two pathways used aspartate as precursor (Galili, 1995; Azevedo and Lea, 2001). Terpene emission depend on drought level and was inhibited in severe-droughted oaks (Brüggemann and Schnitzler, 2002), white and black poplars (Brilli *et al.,* 2007; Fortunati *et al.,* 2008). Their role in response to drought was not well-documented but isoterpene seemed to stabilize lipid membrane under thermal shock (Siwko *et al.,* 2007). These results suggested that transcriptional limitation of terpene synthase activity (GO:0010333) allowed membrane components mobility. One more time, membranes and their components were particularly targeted by modifications (GO:0046658; GO:0016020). Transcripts coding self-associated proteins (GO:0043621) were down-regulated. They concerned all cellular functions as

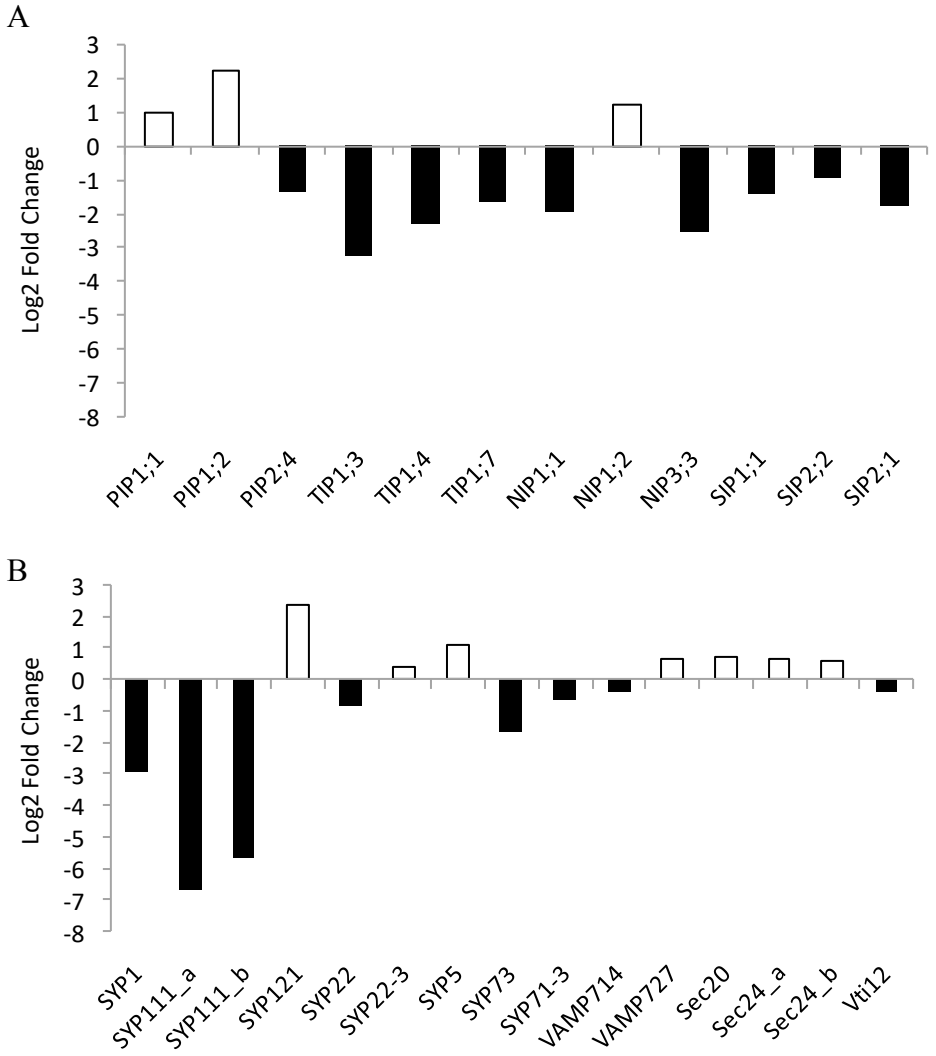


Figure 3. Differentially expressed (Log2 Fold Change) targeted genes among all black poplar genotypes subjected to severe drought (D0). (A) Aquaporins (nomenclature from Lopez *et al*., 2013) and (B) transcripts involved in proteins trafficking (ko04130; SNARE interacting with vesicular transport pathway) were up-regulated (empty bar) or down-regulated (black bar). Only genes expression with significant drought effect detected by Dseq2 for FDR = 0.1‰ was presented here. See supplementary Table for correspondence between gene name and transcript identifier (*P. trichocarpa* v3).

transcription factors (Armstrong *et al.,* 1992; Jeong *et al.,* 2009), G proteins (Adjobo-Hermans *et al.,* 2006), integrins (Knepper *et al.,* 2011), or aquaporins (Fetter, 2004). Finally, leaf transcriptome was deeply remodelled in response to severe drought which suggests new functionalities in agreement with a new leaf structure. Leaf hydraulic safety and cellular integrity may be prevented using osmotic adjustments, trafficking and a decrease of molecules related to carbon assimilation.

Cellular transport is finely regulated under drought

From a general point of view, drought responses of black poplar implied deep transcriptional adjustments targeting gene transcriptional regulations, osmoregulations, detoxification, macromolecules stabilization, primary metabolism, water fluxes regulations and particularly a huge activity in integrity, quality and movements of anchored membranes components (Table 1, Figure 2). As aquaporins are well-known for their role on regulation of membrane permeability to water (Preston *et al.,* 1992; Maurel *et al.,* 1993; Chaumont *et al.,* 2000), we focused on them (nomenclature from Lopez *et al.,* 2013). *XIP* transcripts were not found in our data set contrary to the other isoforms: *PIP*, *TIP*, *SIP* and *NIP*. Aquaporins isoforms were mainly significantly down-regulated (Figure 3A) as obtained in *Arabidopsis* (Alexandersson *et al.,* 2010). In contrast, *PIP1;1*, *PIP1;2* and *NIP1;2* were up-regulated in accordance with results of banana tree subjected to water deficit (Xu *et al.,* 2014). However, antagonist results could be identified along literature in the poplar genus. In tolerant species, as *Populus balsamifera* or in Italian *Populus nigra* populations, *PIP2;5* was up-regulated (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010) although *PIP1;2* and *TIP1;3* were repressed under mild drought (Cocozza *et al.,* 2010). In contrast, *PIP1;3* and *PIP1;2* were up-regulated respectively in the avoidant *Populus simonii x balsamifera* (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010) and black poplar (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010). The avoidant strategy of our black poplar genotypes was concomitant with low aquaporins expression level except *PIP1;1* and *PIP1;2*. However, this pattern did not match with the more drought tolerant genotype (SPM12).

PIP2 and TIP1 isoforms were associated with hydraulic conductance regulation in roots or leaves of maize (Hachez *et al.,* 2008) or *Juglans regia* (Cochard *et al.,* 2006) suggesting water fluxes regulations through plasma membrane and tonoplast. Recently, it was showed that aquaporins PIP2 transported water but also peroxide in *Arabidopsis* (Bienert and Chaumont, 2014) and CO_2 (Zhao *et al.,* 2016). Similar expression of both *PIP1;1* and *PIP1;2* could be explained by their specific interaction in plasma membrane anchor of maize (Fetter, 2004). *PIP1;1* expression favoured stem embolism refilling in *Populus trichocarpa* (Secchi

and Zwieniecki, 2010) and managed plasma membrane water permeability (Fetter, 2004; Wang *et al.,* 2016), as observed in leaves of *Arabidopsis* (Sade *et al.,* 2014) and maize (Gaspar, 2003). In addition, soluble CO_2 transited by PIP1 (Kaldenhoff *et al.,* 2014) in tobacco (Otto *et al.,* 2010), in maize (Wang *et al.,* 2016) and in poplar (Secchi and Zwieniecki, 2013). We suspected that the activity of both PIP1 isoforms in our severe drought conditions could be involved in cellular homeostasis regulation, and may contribute to leaf embolism refilling. In addition, PIP2 could be internalized to stop water fluxes with extracellular compartment in addition of down-regulation. Aquaporins subfamilies with the lower number of isoforms, such as SIP1, SIP2, NIP1 and NIP3, were less studied and their activities in limiting and non-limiting conditions were poorly understood.

Genes related to trafficking of aquaporins were modulated

The down-regulation of aquaporins genes could led to the internalization of channels into cytoplasm then their degradation, as observed in *Arabidopsis* subjected to drought because of PIP2 degradation by the complex ubiquitin proteasome (Lee *et al.,* 2009). This phenomenon was coupled to internalization of PIP observed under salt stress in *Arabidopsis* (Boursiac, 2005), the fastest way to regulate the quantity and activity of PIP under environmental changes. Trafficking of PIP1 and PIP2 from endoplasmic reticulum to plasma membrane, called anterograde trafficking, is regulated by intermediate proteins belonging to vesicular transport and syntaxins (Luu and Maurel, 2013; Chevalier and Chaumont, 2015). PIP was transported from endoplasmic reticulum to Golgi by vesicle after recognition of PIP motif by Sec24 subunit of COPII coat complex (Chevalier *et al.,* 2014) localized in endoplasmic reticulum as Sec20 (Paul *et al.,* 2014). Our results have shown the over-expression of *Sec24* and *Sec20* genes (Figure 3B). In our experiment, *VAMP727* was over-expressed and *VAMP714* repressed (Figure 3B). The later favoured trafficking between plastids and mitochondria (Paul *et al.,* 2014) and was involved in ROS localization (Leshem *et al.,* 2010). Vesicle-associated membrane proteins 721 and 722 (VAMP721-722) are suspected to be involved in secretory trafficking of PIP2 and TIP1 (Zhang *et al.,* 2011; Hachez *et al.,* 2013). We hypothesized that difference between VAMP7 isoforms expressions underlined functional specificity which could depend on physiological status of the plant under drought. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor protein attachment protein receptors (SNARE), a huge syntaxin plant subfamily (SYP), favoured vesicle fusion carrying PIP to plasma membrane (Peer, 2011). SYP121 fixed PIP2;5 in maize (Besserer *et al.,* 2012) and PIP2;7 in *Arabidopsis* (Hachez *et al.,* 2014) negatively regulating plasma membrane

	Dimension			
	1	2	3	4
RDPI	-0.21	0.11	0.97	-0.05
Log2FC	0.23	0.92	-0.02	0.31
CountsW	0.75	-0.49	0.21	0.39
CountsD	0.88	0.20	0.06	-0.43

Table 2. Principal Component of Analysis loading (PCA) on transcript parameters of the six black poplar genotypes under well-watered (W) and drought (D) conditions. Quality of representation values was detailed for the fourth dimensions. RDPI = Relative Distance of Plasticity Index (estimating transcriptional plasticity), Log2FC = differential expression of transcripts, Count = copy number of each transcript.

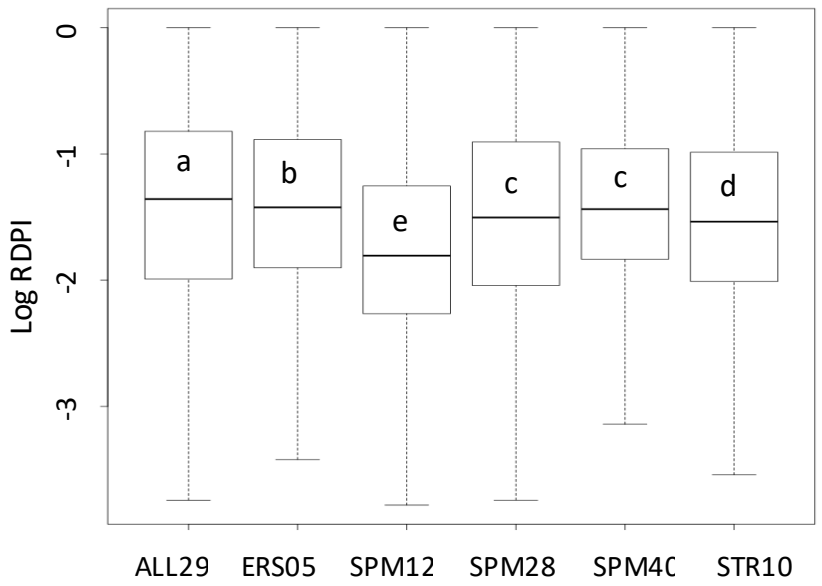


Figure 4. Boxplot of log-transformed estimated plasticity as Relative Distance of Plasticity Index (RDPI) of transcripts of six black poplar genotypes subjected to severe drought (D0). Transcriptional plasticity was studied on 25,430 transcripts common to the six genotypes. Results of one-way ANOVA and post-Hoc HSD Tukey's test were indicated by letters. Same letters indicate no differences between groups.

anchor, internalization for retrograde trafficking or osmotic adjustments. *SYP121* were found highly up-regulated concomitantly with down-regulation of *PIP2;4*. In addition, three genes coding SYP111 were particularly repressed and known to be involved in cell plate forming during mitosis (Müller *et al.,* 2003; Uemura *et al.,* 2004). Retrograde trafficking includes steps in endosome supported by specific SNARE, called SYP2 and Vti1 (Surpin, 2003; Uemura *et al.,* 2004), which have been found differentially down-regulated in our drought conditions. It would be interesting to study their role in aquaporins trafficking. *SYP73*, previously identified as SNARE localized in endoplasmic reticulum (Uemura *et al.,* 2004), were particularly repressed in our drought conditions.

Our results showed that the functioning of "SNARE interactions in vesicular transport" pathway was particularly affected by drought. They should play a crucial role in membrane stabilization, communication with cell wall (Ebine and Ueda, 2015) and cellular homeostasis under drought. As previously suspected by (Hachez *et al.,* 2013), we think that specific regulation of aquaporin recycling by SNARE should constitute an interesting issue to understand thin modulation of channels trafficking.

The transcriptional plasticity was genotype specific

Molecular bases of phenotypic plasticity are still unclear despite great advances in epigenetic and Quantitative Trait Loci analyses (Fabbrini *et al.,* 2012; Han and Wagner, 2014; Alsdurf *et al.,* 2016; Thomas *et al.,* 2016). The relationships between plasticities of gene expression and physiological traits of black poplar genotype subjected to drought were studied using the Relative Distance of Plasticity Index (RDPI). The 25,430 transcripts expressed from all genotypes were retained for the analysis. Correlations between expression levels, normalized counts and transcriptional plasticity were verified using a Principal Component of Analysis (PCA; Table 2). No significant correlations were found between plasticity and expression level of transcripts or normalised counts on the first three dimensions totalizing 90% of the total variance. This result suggested that plasticity regulation of transcripts was mainly decoupled of their expression and can be explored independently of gene expression without redundancy.

Black poplar genotypes revealed specific mean transcriptional plasticity. SPM12, considered as the more drought tolerant based on its physiological responses, had the lowest transcriptional plasticity (Figure 4). The other five avoidant genotypes, exhibited significantly higher mean transcriptional plasticity, especially ALL29. Transcriptional plasticity was not well documented in plants subjected to environmental stimuli. We found that black poplar

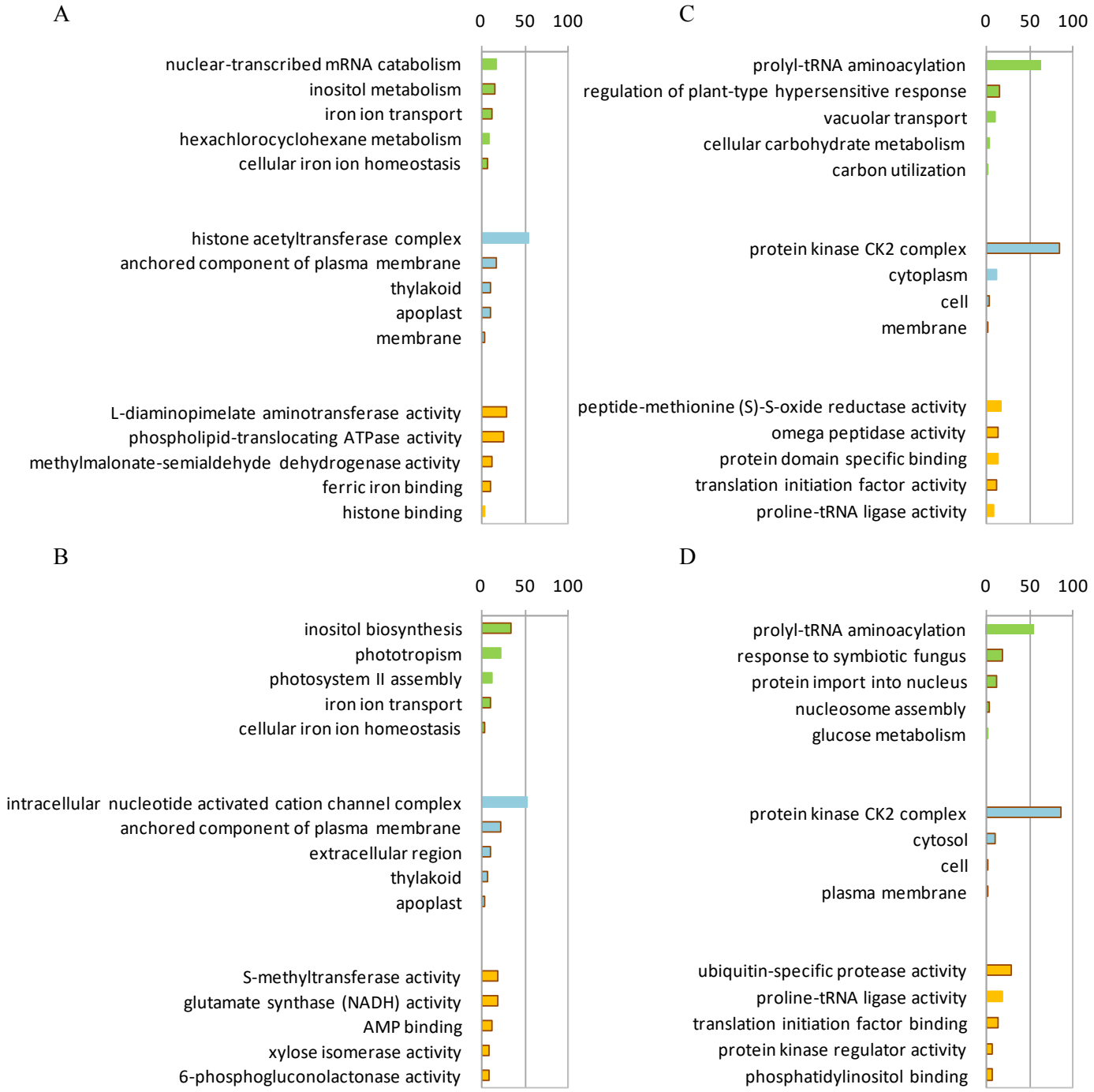


Figure 5. The five most represented functional categories among transcripts studied for their plasticity. Relative proportion of over-represented Gene Ontology (GO) was estimated among transcripts with (A, B) the highest plasticity and (C, D) the lowest plasticity. Same GOs were found in all genotypes (red box) and others GOs were genotype specific especially for (A, C) ALL29 and (B, D) SPM12. Biological process (green), cellular component (blue) and molecular function (orange) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels.

subjected to drought exhibited transcripts number specific to genotypes despite similar genes expressions. Their ability to sustain growth under drought was positively correlated to the magnitude of transcripts abundance. These results were in accordance with *Populus balsamifera* study (Hamanishi *et al.,* 2010), suggesting that the expression and the range of transcripts counts, also called plasticity, have not the same source of genetic regulation. We suggest that such transcriptional plasticity could favour specific acclimation capacity of genotypes as observed for magnitude of transcript abundance of *Arabidopsis* genotypes (Hannah, 2006) and *Populus balsamifera* (Hamanishi *et al.,* 2012) under abiotic stimuli.

Functions related to transcriptional plasticity differend among genotypes

Functional characterization was applied on highly and poorly plastic transcripts among the 25,430 common to the six genotypes, defined respectively as the first and the last quartile of transcripts distribution per genotypes. All genotypes shared around 40% of highly plastic transcripts (data not shown). They were belonging to lipid signalling pathway (GO:0006020; GO:0008654); involved in modifications of membrane structure (GO:0005576), anchored components in membranes (GO:0046658; Hou *et al.,* 2016), cellular homeostasis (Hare *et al.,* 1998), or stomatal aperture under drought stress (Poccia and Larijani, 2009). Transcripts involved in iron ion homeostasis (GO:0006879; GO:0008199) were particularly plastic. This ion, specially accumulated in thylakoids (GO:0009579), is a cofactor of many enzymes implied in electron transport (Jain and Connolly, 2013; Vigani *et al.,* 2013). In addition, serine/threonine protein phosphatase complexes (GO:0008287; GO:0004722), involved in earlier steps of abiotic stress signal transduction (País *et al.,* 2009; Golldack *et al.,* 2014), were highly plastic. Aldehyde dehydrogenase family (GO:0004491), participating to the increase of plasticity, allowed osmolytes biosynthesis during drought (Singh *et al.,* 2013). In addition, high plasticity was observed on intra-cellular amino acid movements (GO:0010285; GO:0006826), which was in concordance with previous conclusions suggesting cellular homeostasis regulations by osmolytes (Pratelli and Pilot, 2014).

Around 60% of highly plastic transcripts were genotype-specific favouring particular strategy. Functional categories of these transcripts were explored for 2 genotypes with the highest and the lowest plasticity (ALL29 and SPM12 respectively). Two biological processes were specific of ALL29 (Figure 5A): nuclear-transcribed mRNA catabolism (GO:0000184) and hexachlorocyclohexane metabolism (GO:0019497). Degradation of mRNA was stimulated faster than amino acids anabolisms (Less and Galili, 2008), especially during drought (Yi *et al.,* 2015). This suggested that post-transcriptional regulations of plasticity

were as important as transcriptional regulations. The second process was related to cellular functions modified by the hexachlorocyclohexan pesticide (Yi *et al.,* 2013) which could induced defence reactions against biotic or abiotic stresses. In ALL29, considered as drought avoidant, the highest plasticity could be attributed to histone acetyltransferase complex (G0:0000123; GO:0042393). Drought tolerance was modulated by this complex in Arabidopsis (Vlachonasios *et al.,* 2003) increasing ABA sensitivity (Joshi *et al.,* 2016) through SNS1 genes superfamilies. To conclude, the genotype showing avoidance strategy had a large mean transcriptional plasticity (ALL29) favoured by transcripts involved in DNA and RNA regulations, and hormone sensitivity. The more drought tolerant genotype with the lowest mean transcriptional plasticity (SPM12) exhibited high plasticity for transcripts involved in light harvesting and phototropism (GO:0009638) and photosystem II assembly (GO:0010207; Figure 5B). Phototropism was induced under drought in *Arabidopsis* by one phototropin, enhancing root growth (Galen *et al.,* 2007). Components of photosystem II, were usually repressed under drought conditions in *Malus* genotypes (Zhou *et al.,* 2015) until photoinhibition occurred by oxidative stress (Masojídek *et al.,* 1991). Highly plastic transcripts coding cyclic nucleotide-gated ion channels (GO:0017071) involved in cation transport (Kaplan *et al.,* 2007), could transport secondary messengers such as calcium favouring drought signalling (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Nawaz *et al.,* 2014). Plasticities of primary metabolism and membrane signalling transporter were increased in our drought tolerant assimilated genotype.

Around 13% of “poorly plastic transcripts » were common to all genotypes. Plasticity were conserved in black poplar genome for ubiquitin-dependant protein catabolism (GO:0006511), tropism (GO:0009606) and multicellular development (GO:0007275). Ubiquitin proteasome system was highly activated under drought (Yee and Goring, 2009) and involved in many mechanism as aquaporins (Leitch *et al.,* 2001) and transport (Paez Valencia *et al.,* 2016) regulations. Tropism can be stimulated under drought with root hair biosynthesis which could increase water collection area (Cassab *et al.,* 2013). Low plasticity touched every cellular compartment (GO:0005654; GO:0005829; GO:0005623; GO:0005618; GO:0005956) in translation regulation (GO:0008135), enzymes regulator (GO:0030234) and hydrolase activity (GO:0016787). Around 87% of poorly “plastic transcripts” were genotype-specific. Nevertheless, the two genotypes, ALL29 and SPM12, presented common functional categories as prolyl-tRNA aminoacylation and proline-tRNA ligase activity (GO:0006433; GO:0004827; Figure 5C-5D). Both contributed to the regulation of proline accumulation in *Raphanus sativus* (Hara *et al.,* 2003; Pang *et al.,* 2014). The lowest plastic genotype (SPM12)

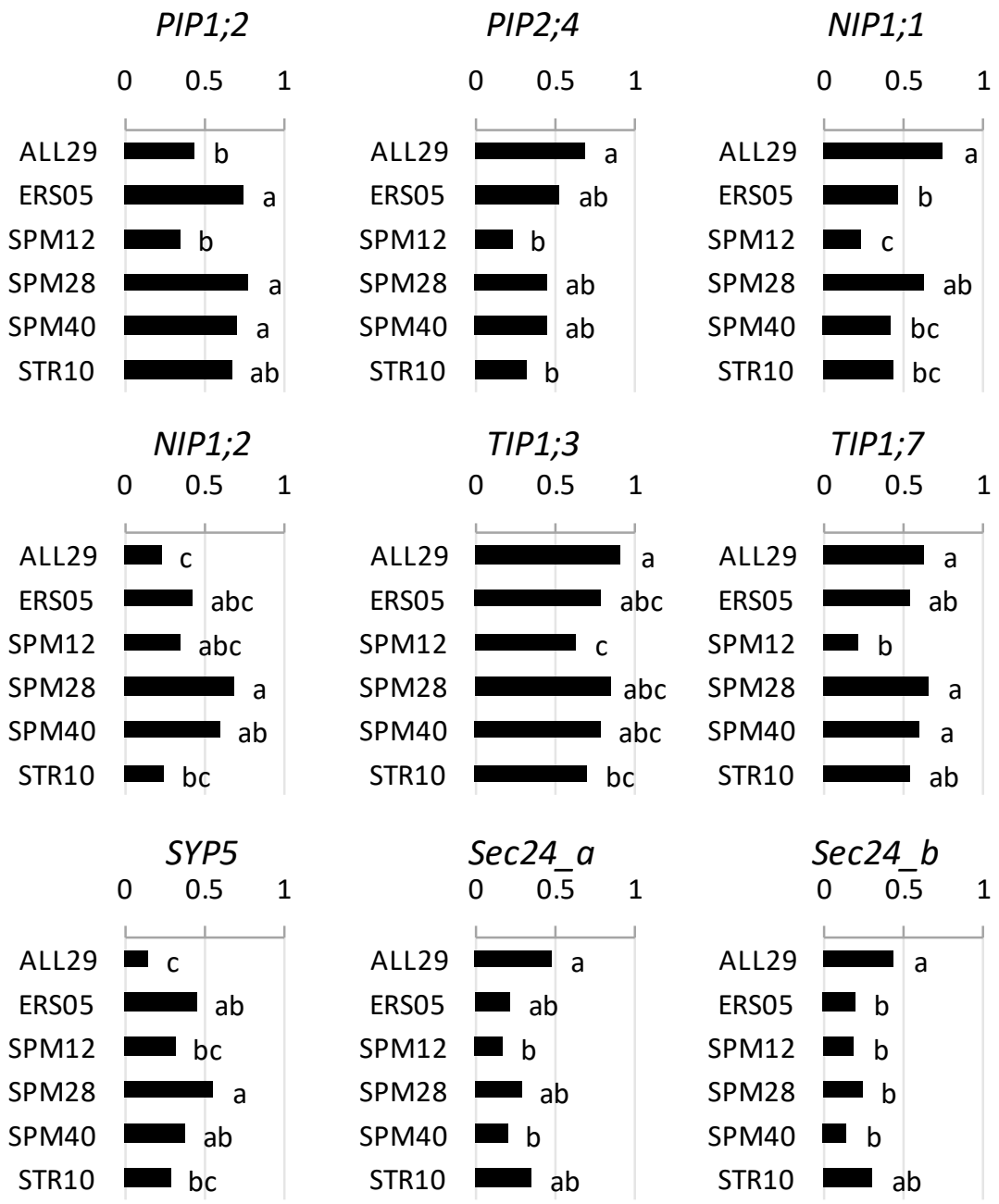


Figure 6. Plasticity estimated as Relative Distance of Plasticity Index (RDPI) of targeted genes among the whole black poplar genotypes. Results of one-way ANOVA and post-Hoc HSD Tukey's test were indicated by letters for aquaporins subfamilies (PIP, TIP, NIP) and transcripts involved in proteins trafficking (Syntaxin, Sec). See supplementary Table for correspondance between gene name and transcript identifier (*P. trichocarpa* v3).

possessed low plasticity for glucose metabolism category (GO:0006006), included in cellular carbohydrate metabolism (GO:0044262) found in the other genotype (ALL29). Sugar-sensing, with soluble sugar as glucose, was essential in abiotic stress signalling (Rosa *et al.,* 2009) and cellular homeostasis (Hare *et al.,* 1998; Krasensky and Jonak, 2012). Low plasticity for carbon utilization (GO:0015976) was present in ALL29 genotype, involved in carbon depletion-sensing under drought (McDowell, 2011). These results showed that one genotype (ALL29) is characterized by low plasticity for every carbohydrate metabolism, and that the other (SPM12) is specialized in low plasticity of glucose metabolism. In addition, vacuolar transport plasticity (GO:0007034) appeared low in ALL29 genotype, suggesting particular regulation of sugars, water and ions fluxes through tonoplast (Jarzyniak and Jasinski, 2014). These biological processes were stood in cytoplasm (GO:0005737) and membrane (GO:0005886). They were supported by protein binding and peptide methionine sulfoxide reductase (MSR; GO:0008113), a large gene family oxidizing methionine (Le *et al.,* 2013), implicated in ROS scavenging (X., Wang *et al.,* 2016) and drought tolerance in rice (Siddiqui *et al.,* 2014; Kim *et al.,* 2014).

Phenotypic plasticity uses energy which must be in accordance with the level of environmental signal to avoid energy loss (DeWitt *et al.,* 1998; Steinger *et al.,* 2003; Valladares and Niinemets, 2008). In our experiment, one genotype (SPM12), identified as tolerant because it maintained growth, exhibited the lowest mean transcriptional plasticity. In this case, energy cost for plasticity modifications concerning light harvesting appeared optimum at short term. On the other side, the avoidant genotype (ALL29) showed the highest mean transcriptional plasticity. This last genotype appeared more sensitive to drought during our experiment and we hypothesized that its transcriptional plasticity modifications should be less effective than the other one. However, we didn‟t prospect long term consequences of plasticity (trade off) on absolute fitness or on drought responses of their offsprings.

Plasticity regulation of some aquaporins and trafficking-related genes depended on genotype

Plasticity levels of *PIP1;2, PIP2;4, TIP1;3, TIP1;7, NIP1;1* and *NIP1;2* (Figure 6) under severe drought were different among genotypes. Similar observations concerning syntaxin as *SYP5* and *Sec24*-domain genes involved in vesicular transport (ko04130) were made. Many studies revealed that aquaporins transcripts abundance varied with time of day (Mcelrone *et al.,* 2007; Lopez *et al.,* 2013) and along drought responses establishment (Surbanovski *et al.,* 2013; Pou *et al.,* 2013; Li *et al.,* 2016). These results suggested that their

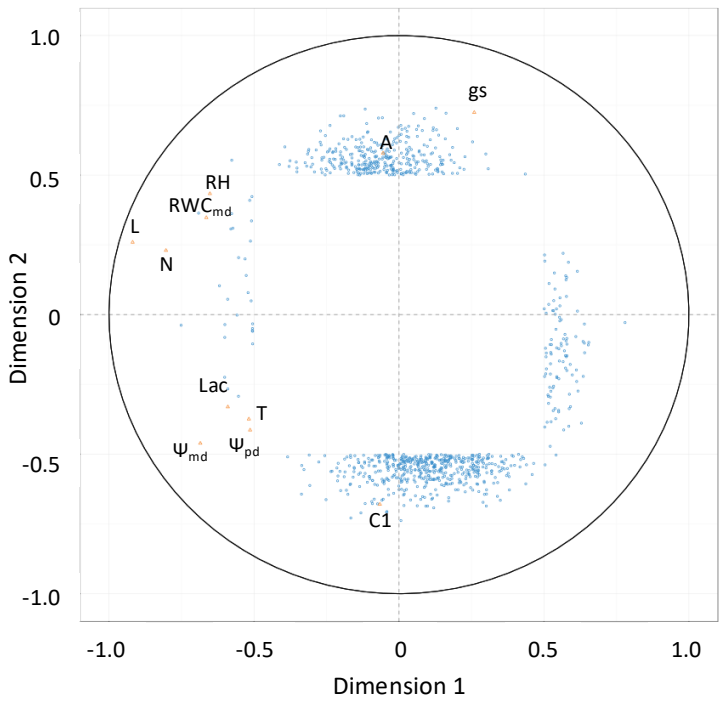


Figure 7. Regularized Canonical Correlation Analysis on plasticity using Relative Distance of Plasticty Index (RDPI) estimated for traits measured on six black poplar genotypes subjected to drought. Correlation circle of transcripts (blue points) and ecophysiological traits (orange points) RDPIs. Only correlations upper 0.5 were represented. Variables abbreviations: gs = stomatal conductance; A = carbon assimilation; RH = relative humidity; RWCmd = midday relative water content; L = longitudinal growth; N = new leaf number; Lac = lacuna surface; T = total leaf number variation; Ψpd = predawn leaf water potential; Ψmd = midday leaf water potential; C1 = surface of midrib.

transcriptional plasticity depends on genotypes. The other aquaporins and SNARE-related transcripts did not characterize genotypes in our conditions.

Plasticity of aquaporins, syntaxin and sec-domain genes expression was preferentially high for two genotypes (ALL29 and SPM28) characterized as drought avoidant with high mean transcriptional plasticity. In contrast, the genotype with the lowest transcriptional plasticity was considered as drought tolerant and exhibited the lowest mean transcriptional plasticity (SPM12). To conclude on a large scale, genotype influenced regulation of plasticity level, particularly for some transcripts belong in membrane channels and vesicular transport. In addition, energy investment for plasticity regulation should be heterogeneous among genotypes. Nevertheless, the link between physiological strategies, transcriptional plasticities and water fluxes regulations remains blurred. That is why the correlation between phenotypic and transcriptional plasticities was examined.

Phenotypic plasticity was supported by specific cellular function plasticities

Plasticities of transcripts, physiological, growth and anatomical traits were compared using regularized Canonical Correlation Analysis to identify cellular functions supporting phenotypic plasticity (Figure 7). Correlations between transcriptional and phenotypic plasticities were similar among genotypes although previous observations concluded on genotypic specificity of transcriptional and phenotypic plasticities. These results can be explained by the fact that plasticity study was not exhaustive and exclusively based on *a priori*-selected traits. In addition, plasticity of molecular stages was set deliberately apart, as protein abundance, for those plasticity regulations should impact phenotypic responses. A first cluster was composed of plasticities of L, N, RWCmd and RH, positively correlated among poplars. Another cluster grouped plasticities of Lac, T and Ψ. Then, A and gs were both highly anti-correlated to C1. These results suggested that regulations of phenotypic plasticity were similar among genotypes. In addition, canonical correlations between phenotypic and transcriptional plasticities from |0.5| to |0.8| concerned 708 transcripts. Stomatal conductance, longitudinal growth and midrib covering plasticities were respectively correlated with the biggest number of transcripts (411, 182 and 88 transcripts, respectively) studied by GSEA. Stomatal conductance plasticity was mainly correlated with plasticity of transcripts involved in cytosol (GO:0005829) and related to endogenous stimulus (GO:0009719), proteolysis (GO:0006508) and flower development (GO:0009908; Figure 8A). These processes were particularly supported by plasticities of transcripts coding enzymes involved in DNA expression (GO:0003700; GO:0008270; GO:0003682) and RNA regulations (GO:0004518).

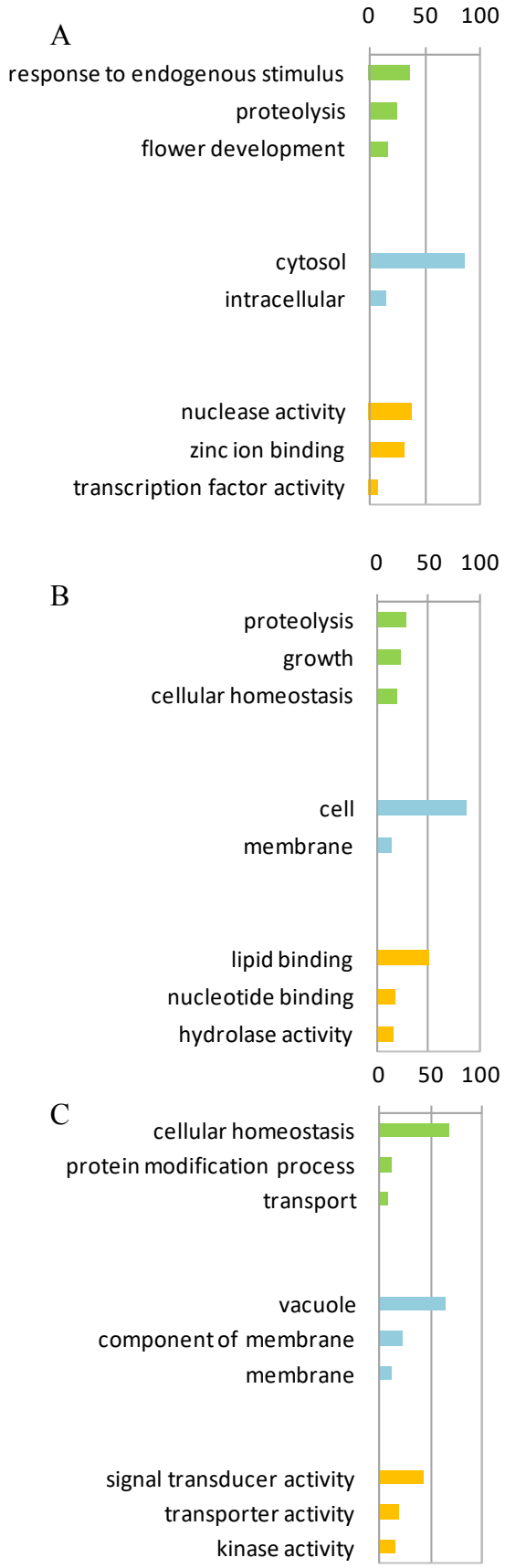


Figure 8. The five most represented functional categories among transcripts studied for their plasticity correlated to three phenotypic traits. Relative proportion of over-represented Gene Ontology (GO) was estimated for transcripts correlated upper than 0.5 with (A) stomatal conductance, (B) longitudinal growth and (C) midrib covering. Biological process (green), cellular component (blue) and molecular function (orange) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels.

Protein degradation and regulation of flower development were known to be differentially regulated under drought, such as AP2/ERF transcription factor of *Arabidopsis* (Su *et al.,* 2013), rice (Abiri *et al.,* 2017) and *Populus* species (Berta *et al.,* 2010; Zhang *et al.,* 2014). The plasticity of longitudinal growth is correlated with plasticity of transcripts mainly involved in proteolysis (GO:0006508), growth (GO:0040007) and cellular homeostasis (GO:0019725; Figure 8B). These functions were mainly spread in cell (GO:0005623) and supported by molecules targeting lipids (GO:0008289) and nucleotides (GO:0000166) and hydrolase (GO:0016787). These results underlined the dichotomy of plant strategy undergoing drought, balanced between growth and cellular homeostasis. In contrast, midrib covering plasticity was essentially associated with plasticity of transcripts involved in cellular homeostasis (GO:0019725; Figure 8C). This was supported by protein modifications (GO:0006464), transport (GO:0006810; GO:0005215) and signalling (GO:0004871; GO:0016301) in vacuole (GO:0005773) and membranes (GO:0016020; GO:0016021). Our results suggested that plasticity regulation of anatomical changes evolved with cellular homeostasis adjustments. This hypothesis was supported by observations made on the association between anatomical changes occurred in leaf fully developed during drought (Cutler *et al.,* 1980; Bosabalidis and Kofidis, 2002 Tosens *et al.,* 2012; Galmés *et al.,* 2013) and osmotic changes (Harb *et al.,* 2010).

Hydraulic and physiological plasticities were linked to aquaporins plasticity

Transcriptional plasticity of severe aquaporins family members was highly correlated to ecophysiological traits (Figure 9A). The more plasticity of *TIP2;1* aquaporin increased, the more midrib covering decreased (correlation of -0.5) and the more carbon assimilation plasticity increased (correlation of 0.34). TIP2;1 aquaporins were anchored in tonoplast and plasma membrane which could favour hydrogen peroxide, ammonia or formamide fluxes between vacuole and cytosol (Hove *et al.,* 2015). A Genome-Wide Association Study identified such aquaporin genes associated with fitness locus, suggested that TIP2;1 could favour local adaptation of *Arabidopsis* (Fournier-Level *et al.,* 2011). In addition, correlation has been found between its expression, leaf hydraulic conductance and stomatal conductance in grapevine under drought (Pou *et al.,* 2013) suggesting an implication of TIP2;1 in water fluxes control in mesophyll. Our results suggested that *TIP2;1* expression was closely linked to regulation of leaf water fluxes, photosynthetic activity and midrib covering. Plasticity of stomatal conductance was negatively correlated with *PIP1;2* plasticity which was also identified as genotype-specific (Figure 6). Compared to aquaporins, transcriptional plasticities

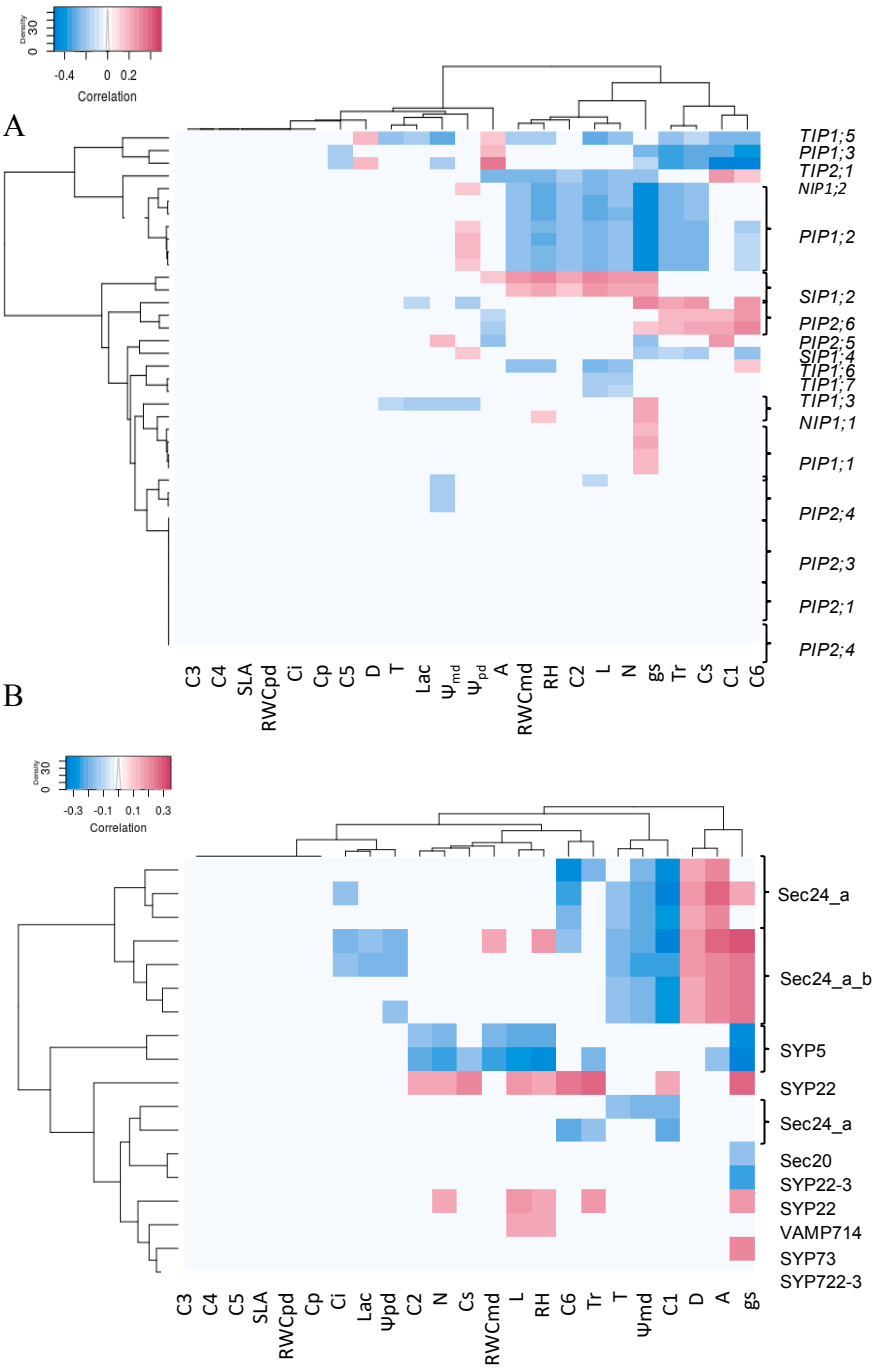


Figure 9. Correlation between phenotypic and transcriptional plasticities. (A) Transcripts coding for aquaporins and (B) for proteins involved in vesicular trafficking (ko04130) were correlated to ecophysiological traits. Heatmap colors indicate positive (pink) and negative (blue) crossed-correlations between phenotypic traits plasticity and transcripts. Hierarchical clustering was performed to group variables. gs = stomatal conductance; Tr = leaf transpiration; Ψ = leaf water potential; RH = Relative Humidity; RWC = Relative Water Content; md = midday; pd = predawn; A = net carbon assimilation; Rd = radial growth; L = Longitudinal growth; N = number of new leaves; T = total leaf number variation; SLA = Specific Leaf Area; C1 to C6 = order 1 to 6 vein covering; D = stomatal density; Cp = palissadic parenchyma covering; Cs = spongy parenchyma covering; Ci = intermediate parenchyma covering; Lac = Lacuna covering.

of genes involved in vacuolar transport were lightly correlated with physiological traits (Figure 9B). Stomatal conductance was particularly targeted by the highest correlations with plasticity of transcripts coding Sec24 domain, SYP22 and SYP5 proteins. Our results clearly suggested that differential abundance of transcripts *PIP1;2, SYP5, SYP22* and *Sec24* supported response plasticity of stomatal aperture under stress.

Interestingly, we observed antagonist correlations between physiological traits and transcripts plasticities which previously showed similar responses. Both *PIP1;2* and *SYP5* were up-regulated with genotype specific plasticity. Their plasticity was negatively correlated with stomatal conductance (gs) plasticity. In counterpart, *Sec24* and *SYP22* plasticities were both positively correlated to gs plasticity although they were up- and down-regulated respectively under drought. This apparent antagonism should be due to the fact that only one time-point measurement was used, although transcriptome was suspected to change throughout the duration of progressive drought as observed in *Populus* species and genotypes (Wilkins *et al.,* 2009; Hamanishi *et al.,* 2010). Transcriptional plasticity should equally reflect present and future physiological modifications in response to drought because of latency time between environmental signal reception, molecular changes and plasticity adjustments.

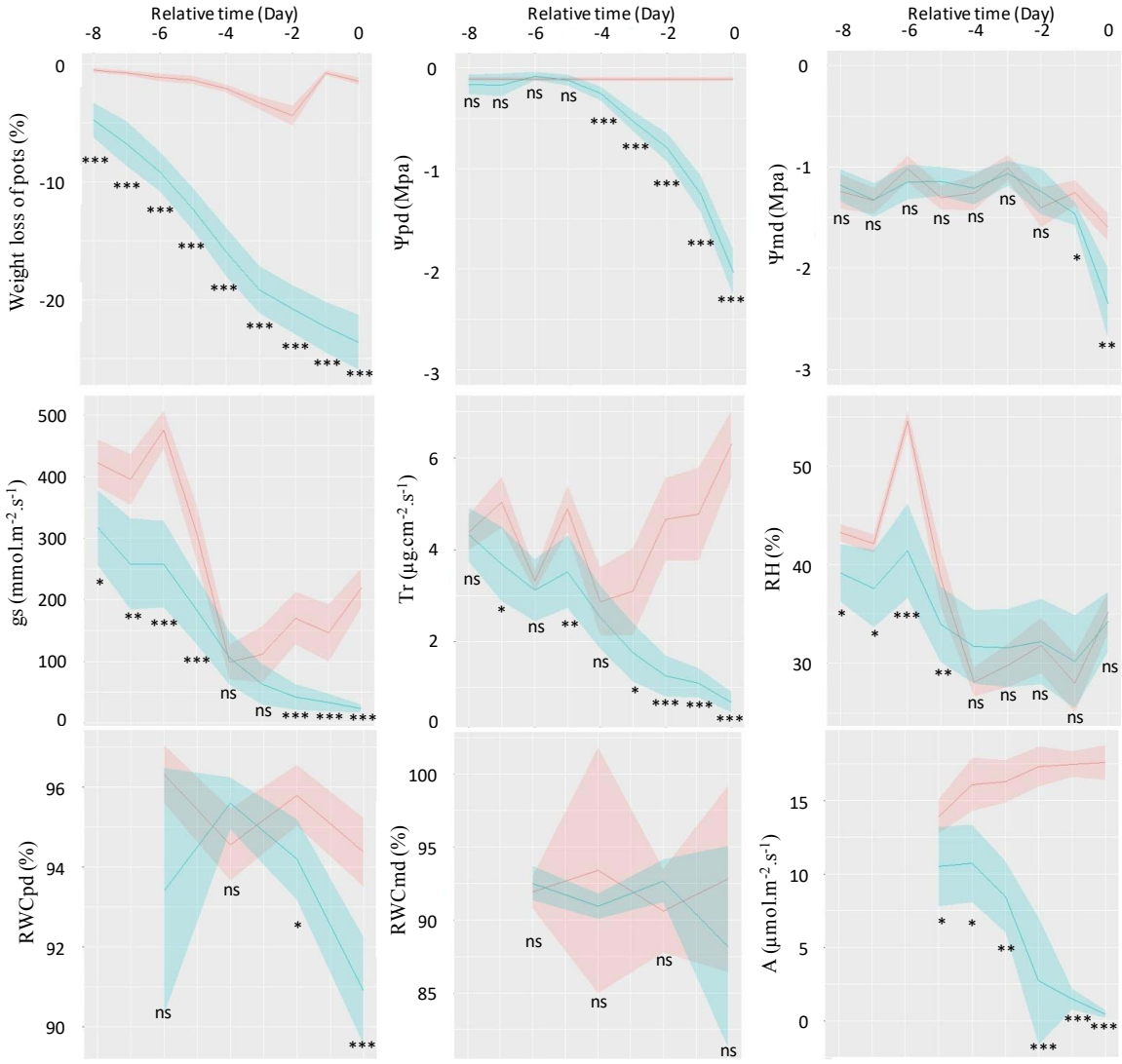
Conclusions

Avoidant strategy was detected in five of the six black poplar genotypes subjected to severe drought, one genotype being the most tolerant. Transcriptional analysis suggested that cellular structure and functioning of black poplars were deeply remodelled through signalling pathways, osmoregulation, macromolecules protection and cellular detoxification. Unusual extreme changes were detected for cellular transport, membrane composition and aquaporins regulating water and small molecules fluxes. Transcriptional plasticity, quantified for the first time in this study, suggested that it was decoupled from genes expression level. In addition, drought tolerance was associated with low transcriptional plasticity of some genes, especially for some aquaporins and syntaxins. Their plasticity was genotype specific. However, correlations between phenotypic and transcriptional plasticities were common to genotypes highlighting that genotypes shared a part of plasticity regulation mechanisms. Research tracks were proposed to understand molecular basis of phenotypic plasticity through correlations between cellular functions and phenotypic traits plasticities, especially stomatal conductance and leaf midrib covering. Further researches are needed to decipher the whole molecular network regulations relative to drought response. This could be approached by leaf transcriptome assessment during the different stages of progressive drought. Then integration

of both phenotypic and transcriptional plasticity appeared as a challenge for future study of trees responses in changing environment.

Acknowledgements - We are most grateful to Stéphanie Massey for providing excellent support in plant production and common garden maintenance work and Laurent Guillemot for technical assistance.

Supplementary data



Supplementary Fig. 1. Mean (± SE) physiological and growth traits of black poplars in well-watered (red line) and drought (blue line) conditions over relative time. Results of two-way ANOVA with repeated measures and pairwise contrast were indicated (*0.01 < *P* < 0.05; ** 0.01 < *P* < 0.001 ;***P < 0.001; ns = non-significant). Ψ = leaf water potential; RWC = realtive water content; pd = predawn; md = midday; gs = stomatal conductance; Tr = transpiration; RH = relative humidity of the environment; A = net carbon assimilation.

Supplementary Table 1. Differentially Expressed Genes number of black poplar genotypes leaf blade subjected to severe drought. Statistical analyses were performed to test the drought effect on genes expression according different scale, either the whole studied genotypes (All genotypes) or each of the six genotypes.

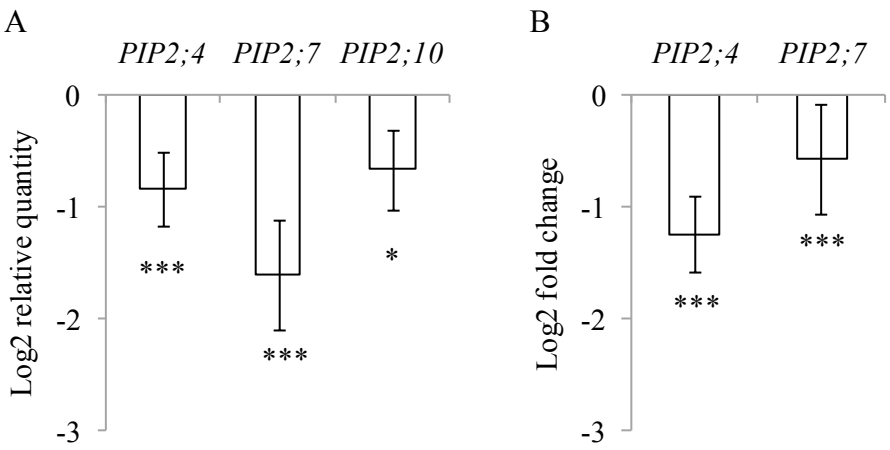
Scale	Up-regulated	Down-regulated	Non-differentially regulated
All genotypes	11,486	14,731	37,329
ALL29	32	45	60,298
ERS05	14	3	63,529
SPM12	9	8	25,413
SPM28	36	7	60,332
SPM40	126	35	57,041
STR10	5	10	63,531

Supplementary Table 2. Statistical informations of per-sample paired-ends reads of six black poplar genotypes subjected to well-watered (W) or severe drought (D). The detected reads were firstly cleaned and then mapped on *Populus trichocarpa* transcriptome v3. The total analyzed reads were provided from "Used reads" category after removing reads from mapped ones.

Genotype	Treatment	Sample	Total reads	Useful reads	Removed reads (%)	Mapped reads (%)	Used reads (%)
ALL-29	D	9	12,821,285	8,587,277	-17	81	67
ALL-29	D	17	13,422,120	9,544,922	-13	82	71
ALL-29	D	19	18,086,791	14,943,086	-2	85	83
ALL-29	D	25	15,559,587	12,827,927	-2	84	82
ALL-29	W	37	8,920,858	7,174,811	-4	84	80
ALL-29	W	37B	16,860,267	13,922,821	-4	86	83
ALL-29	W	43	11,323,801	9,038,766	-5	84	80
ALL-29	W	45	17,773,587	11,827,676	-3	87	83
ERS-05	D	12	13,261,438	8,094,470	-15	72	61
ERS-05	D	16	11,702,334	9,657,550	-3	85	83
ERS-05	D	35	13,387,419	11,109,665	-2	85	83
ERS-05	D	48	15,911,186	12,946,017	-3	84	81
ERS-05	W	10	17,539,137	14,793,162	-3	87	84
ERS-05	W	21	12,801,875	10,695,948	-3	86	84
ERS-05	W	41	13,997,915	11,316,002	-4	84	81
ERS-05	W	44	16,541,161	13,865,923	-3	87	84
SPM-12	D	6	13,882,955	11,207,267	-3	84	81
SPM-12	D	6B	22,406,528	18,481,964	-3	85	82
SPM-12	D	20	16,853,682	13,795,574	-3	84	82
SPM-12	D	46	11,609,533	9,224,537	-4	83	79
SPM-12	W	11	13,095,445	10,822,174	-4	86	83
SPM-12	W	36	29,959,594	24,308,886	-4	84	81
SPM-12	W	47	10,754,141	8,892,005	-4	86	83
SPM-28	D	8	13,152,096	8,701,178	-18	80	66
SPM-28	D	24	12,980,823	10,403,837	-4	84	80
SPM-28	D	42	10,998,117	9,025,144	-3	85	82
SPM-28	W	4	10,955,507	6,838,356	-22	80	62
SPM-28	W	27	14,294,102	11,827,676	-5	87	83
SPM-28	W	40	29,484,458	24,089,737	-5	86	82
SPM-28	W	40B	16,780,151	13,941,939	-4	86	83
SPM-40	D	2	15,673,159	9,766,629	-17	76	62
SPM-40	D	13	12,696,516	8,082,735	-17	76	64
SPM-40	D	22	13,848,456	11,244,986	-3	84	81
SPM-40	D	22B	15,492,970	12,700,265	-3	84	82
SPM-40	D	39	14,654,464	12,406,440	-2	86	85
SPM-40	D	39B	15,372,255	12,782,373	-3	86	83
SPM-40	W	14	12,249,507	8,070,183	-19	81	66
SPM-40	W	28	14,141,302	11,693,401	-4	86	83
SPM-40	W	29	13,539,935	9,137,270	-17	81	67
SPM-40	W	30	11,800,439	6,822,603	-22	74	58
STR-10	D	1	12,069,545	7,798,285	-18	78	65
STR-10	D	38	14,252,643	9,663,665	-14	79	68
STR-10	W	7	11,379,879	9,396,915	-4	86	83
STR-10	W	26	11,182,921	7,415,407	-18	81	66
STR-10	W	26B	15,430,974	1,276,513	-3	85	83
STR-10	W	31	17,556,852	15,298,134	-1	88	87
STR-10	W	31B	16,136,195	13,453,294	-4	87	83
		Average	14,778,636	11,497,964	-7	83	78

Supplementary Table 3. Informations on primers used to amplify the three internal control aquaporins cDNA by Q-PCR. Three studied aquaporins were amplified among six black poplar genotypes in well-watered and severe drought conditions using primers with defined annealing temperatures.

Aquaporin	Primer		Annealing temperature (°C)
	Forward	Reverse	
PtPIP2;4	CCAACGGTTTTAAATCTCGGTTC	ACCGAAAGGGATAATAAAGGG	56.0
PtPIP2;7	ATGACCATTGGCTCTTCTGG	GGCTTTAAGCATTGCTCCTG	56.0
PtPIP2;10	CACAGTCGTGGTCAAGATGTC	ACTAGTTGATTATGAGATAGGGAG	56.0



Supplementary Figure 2. Expression level of aquaporins obtained by Q-PCR (A) and RNAseq (B). Log-transformed data were respectively analyzed by t-test and Wald"s test using R Deseq2 package. *PIP2;10* transcritps have not been found in RNAseq data set.

Supplementary Table 4. Transcript identifier corresponding to targeted gene name differentially expressed in the whole black poplar genotypes. Annotations were provided from *Populus trichocarpa* transcriptome v3.

Gene name	Transcript identifier
Aquaporins	
NIP1;1	Potri.004G063000
NIP1;2	Potri.011G072100
NIP1;2	Potri.011G072100
NIP3;3	Potri.001G455000
PIP1;1	Potri.010G191900
PIP1;1	Potri.010G191900
PIP1;2	Potri.008G065600
PIP2;4	Potri.008G039600
SIP1;1	Potri.013G053400
SIP2;1	Potri.016G024900
SIP2;2	Potri.006G027200
TIP1;3	Potri.010G209900
TIP1;4	Potri.008G050700
TIP1;7	Potri.009G005400
ko04130	
Syp73_a	Potri.006G129500
Syp73_b	Potri.016G088200
Sec20	Potri.010G064900
Sec24_a	Potri.008G049700
Sec24_b	Potri.010G211100
Stx1-4_a	Potri.007G023100
Stx1-4_b	Potri.013G053200
Stx1-4_c	Potri.016G068600
Stx1-4_d	Potri.019G030800
Stx7_a	Potri.001G138500
Stx7_b	Potri.003G095300
Stx8	Potri.006G032800
VAMP7_a	Potri.018G025800
VAMP7_b	Potri.010G239900
Vti1	Potri.008G091000

Supplementary Table 5. Power of detection of expressed transcripts of six black poplar genotypes subjected to severe drought. The total number of transcripts detected in each genotype were subjected to statistical analysis determining their power detection in the worst quartile associated to *P*-value. Conclusions on power detection were provided in the last column.

Genotype	Read depth (Mseq)	Minimum transcripts observed	Detection power of 3x fold change in worst quartile read depth	Transcripts (*P*-value < 1%) in best quartile read depth	Power quality
ALL29	30	63288	79%	84%	Well powered
ERS05	29	64158	73%	78%	Well powered
SPM12	38	63139	74%	82%	Well powered
SPM28	38	62683	64%	84%	Well powered
SPM40	28	64075	70%	73%	Slightly under powered
STR10	29	61411	74%	78%	Well powered

Chapitre III

Etude comparative des réponses transcriptionnelles entre nervure principale et limbe de la feuille de peuplier noir à une sécheresse

Chapitre III :
Etude comparative des réponses transcriptionnelles entre nervure principale et limbe de la feuille de peuplier noir à une sécheresse

Cet article a été rédigé pour être soumis dans le journal *Plant Biology*.

Contexte

Le changement climatique s"accompagne d"une augmentation de la fréquence et de la sévérité des sécheresses. Les modifications environnementales sont perçues par les espèces végétales à des degrés divers dépendant du génotype qui répondent par des ajustements phénotypiques et moléculaires. Les régulations moléculaires sont spécifiques des organes qui possèdent un rôle précis pour assurer le bon fonctionnement de la plante. De telles ajustements phénotypiques associés un remaniement profond du transcriptome du limbe ont été identifiées le peuplier noir répondant à un déficit hydrique progressif (Chapitre II). De plus, nos résultats démontrent que le système nervaire, notamment la nervure principale, est touché par des modifications anatomiques, ce qui pourrait impliquer une régulation moléculaire spécifique du développement de la nervure.

Ce travail vise à comparer les réponses transcriptionnelles de deux zones fonctionnelles de la feuille que sont la nervure principale et le limbe en réponse à la sécheresse chez six génotypes de peuplier noir.

Résultats

L"analyse du transcriptome de la nervure principale indique 20% de Differentially Expressed Genes (DEG) par rapport aux 41% identifiés dans le limbe sur les mêmes échantillons foliaires.

Certaines fonctions cellulaires semblent coordonnées au sein de la feuille car 11 639 DEG communs aux deux compartiments foliaires suivent le même schéma d"expression. En revanche, 958 DEG et 14 578 DEG sont respectivement spécifiques de la nervure principale et du limbe, discriminant le fonctionnement des ces zones fonctionnelles. Les DEG spécifiques de la nervure montrent une activité intense des métabolismes du glyoxylate et des carbohydrates, et une induction de la transduction du signal par le calcium, de facteurs de

transcription et des métabolites secondaires. Le transport extra- et intra-cellulaire est très limité (voire absent puisque les gènes liés au transport vésiculaire ne sont pas exprimés) dans la nervure principale. Ces résultats conduisent à l"hypothèse selon laquelle l"accumulation de solutés et de sucres dans le phloème augmenterait le potentiel osmotique. Ceci forcerait le transfert d"eau du xylème vers le phloème et ainsi engendrerait une différence de potentiel entre cellules pour provoquer un flux de sève, certes faible, mais continu au sein de la feuille. Ce mécanisme repousserait l"échéance de l"embolie xylémienne.

Le limbe présenterait un autre processus, au travers de DEG spécifiques, qui serait basée sur la préservation de l"intégrité des cellules passant par une modification de la composition des membranes et le maintien de l"homéostasie cellulaire au détriment de la fixation de carbone. Ces modifications sont soutenues par une expression intense des gènes liés au transport extra- et intra-cellulaire qui semble un pilier majeure du fonctionnement du limbe.

Conclusions

La régulation de l"expression génique est conservée entre les deux zones fonctionnelles pour de nombreux transcrits. En revanche, une partie de la régulation transcriptomique est spécifique de ces zones en réponse à un déficit hydrique sévère. Ceci indique que la fonctionnalité des types cellulaires va influencer la régulation transcriptionnelle, ce qui pourrait contribuer au maintien de l"intégrité de l"organe entier en réponse à la sécheresse.

Title: Insight into leaf tissue specific transcriptional modulations in drought conditions

Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Venisse Jean-Stéphane, Philippe Label, Aurélie Gousset-Dupont*

Authors' address:
Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

*Corresponding author (Aurelie.GOUSSET@uca.fr, +33 4 73 40 79 29)

Abstract

Extreme events, such as drought, are expected to increase in frequency and intensity in the future. Trees possess specific abilities in phenotypic and molecular adjustments to respond to environmental conditions depending in part on the genome expression regulation. Perennial plants exergue multiple regulations levels provided by cell types. This study explores the potential of transcriptional regulations occurring in leaf tissues responding to drought. Two-year-old French black poplars were subjected to progressive water deficit until they reached severe drought. Phenotypic, physiological and anatomical responses characterized the physiological status of trees. Leaf blade and midrib transcriptome were analyzed by RNAseq, then cellular functions were associated with the two data sets to depict the role of tissue type in drought responses. Around 40% of the whole leaf blade transcriptome were differentially expressed compared to 20% for the midrib transcriptome. Patterns of Differentially Expressed Genes (DEG) found in midrib and leaf blade were similar, suggesting that cellular function regulations were shared between leaf tissues in response to severe drought. Nevertheless, DEG have been found regulated only in one of the two leaf compartments: 958 DEG and 14, 578 DEG were midrib and leaf blade specific respectively. Midrib DEG suggested that glyoxylate metabolism was activated, in addition of carbohydrate metabolism, calcium mediated signal transduction, transcription factors and secondary metabolites. These results, in addition of repression of vesicular transports, suggest that solutes and sugar accumulations were favored in midrib to increase osmotic potential and to maintain xylem and phloem fluxes along the plant subjected to severe drought. The modulation of leaf blade transcriptome can be linked to membrane integrity preservation and cellular homeostasis maintaining using intensive intra- and extra-cellular transport. Our results showed that leaf tissues modulated

transcriptome with a specific manner that could contribute to hydraulic functioning and cellular integrity of the whole leaf organ in severe drought.

Key words: *Populus nigra*, severe drought, transcriptome, leaf blade, midrib, specific modulations

Introduction

Water availability, constitutes the main environmental resource influencing growth, development and distribution of tree species (Bréda *et al.,* 2004; Parmesan and Hanley, 2015). This main resource, mainly depending on rainfalls is expected to be reduced in the global warming context (Beniston *et al.,* 2007; Dai 2011; Burkett *et al.,* 2014). Impacts of water depletion on plant functioning are numerous and can be seen at every plant scale. Successive growth, physiological and development adjustments were commonly observed in plants responding to a progressive soil water deficit (Tardieu and Simonneau, 1998; Marron *et al.,* 2002; Brodribb and Holbrook, 2003; Monclus *et al.,* 2006; Bonhomme *et al.,* 2008; Araújo *et al.,* 2011). Physiological changes, such as the decline of water potential, transpiration rate and stomatal conductance, occurred and carbon assimilation was maintained as long as possible until plant species reached their own internal water depletion limit threatening their survival (Milburn, 1966; Nardini *et al.,* 2001; Brodribb and Holbrook, 2003; Cochard *et al.,* 2007; McDowell 2011). These drought responses determined a continuum of phenotypic responses and allowed to class plants along two strategies: tolerant species maintain growth and development (Gebre *et al.,* 1994; Passioura, 2002; Hanin *et al.,* 2011; Barchet *et al.,* 2013; Isebrands and Richardson, 2014) and the more sensitive species called avoidant species quickly promote leaf abscission (Couso and Fernandez, 2012).

Water circulation in plant involves xylem conducting vessels present in all the plant organs. This water is subjected to fluid mechanics laws: so that the smaller diameters of the vessels are, the more friction forces against the walls increase and the more sap flow decreases. Water diffusion take place along three different ways: the apoplastic pathway through cell walls spaces, the symplasmic pathway through the plasmodesmes and the transcellular pathway through mesophyll cells that can be facilitated by specific channels such as aquaporins (McElrone *et al.,* 2007). Plant compartments exert a resistance to the passage of water that allows assimilating the plant organs to an electrical circuit (Zimmermann, 1983). Many studies have shown the importance of leaves resistance, ranging from 30% to 80% of the whole plant resistance (Nardini *et al.,* 2001; Brodribb *et al.,* 2002; Sack and Holbrook, 2006). This suggests that the leaf water supply system is similar to an electric parallel circuit that guarantees continuous hydration of the leaf blade in case of damage along the circulatory system. Among foliar tissues, the location of the strongest resistance is still debated (Nardini *et al.,* 2001; Cochard *et al.,* 2004; Buckley, 2015) estimates that apoplastic leaf hydraulic conductance is greater than the mesophyll once outside the perivascular sheath. Leaf architecture appears as a crucial lever determining the flow of water in the plant, especially in

Angiosperms leaves that possess a highly developed network of major and minor veins. Vein density and leaf thickness are strongly correlated with hydraulic conductance and maximum photosynthesis in Bryophytes, Lycophytes, Pteridophytes, Gymnosperms and Angiosperms (Brodribb *et al.,* 2007). Thus, in Angiosperms, mesophyll anatomy, vein architecture, stomatal conductance, and leaf hydraulic conductance seem to be inter-correlated (Sack *et al.,* 2003; Aasamaa *et al.,* 2005; Brodribb and Jordan, 2011; Carins Murphy *et al.,* 2014; Feild and Brodribb, 2013).

Large-scale molecular approaches exergue crucial transcriptional modulations supporting macroscopic changes that brought informations of thin hydraulic and metabolic regulations (Street *et al.,* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Wilkins *et al.,* 2009; Cohen *et al.,* 2010; Hamanishi *et al.,* 2015; Viger *et al.,* 2016). Drought signaling induced gene expression remodeling using mainly calcium (Shao *et al.,* 2008), kinases (Marshall *et al.,* 2012), lipids (Ng and Hetherington, 2001; Hou *et al.,* 2016), sugars (Rosa *et al.,* 2009) and Reactive Oxygen Species (de Carvalho, 2008; Jajic *et al.,* 2015). A complex network of transcriptional regulations was engaged using transcriptional factors (Baldoni *et al.,* 2015; Singh and Laxmi, 2015; Joshi *et al.,* 2016) to stabilize macromolecules, to limit oxidative damages and to increase osmotic adjustment (Chaves *et al.,* 2003; Farooq *et al.,* 2009; Sharma *et al.,* 2012; Golldack *et al.,* 2014). Most part of these transcriptional adjustments were under control of abscisic acid (ABA), the most produced plant hormone during water deficit (Wang *et al.,* 2003; Tuteja, 2007).

As phenotypic adjustments, the chronology and the range of the molecular changes evolves with drought intensity (Cohen *et al.,* 2010; Fu *et al.,* 2016), species (McDowell *et al.,* 2008; Xu *et al.,* 2010) and depends on the studied organ. Some gene expression seemed organ-specific in plant subjected to drought. *Prunus persica* showed a higher quantity of Differentially Expressed Genes (DEG) in roots than in leaves, suggesting that roots responses were precocious compared to shoots (Ksouri *et al.,* 2016). Similar results were found in whole transcriptome analysis of leaves and roots of droughted *Arundo donas* (Fu *et al.,* 2016), wheat (Liu *et al.,* 2015), *Populus* (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Cohen *et al.,* 2010; Xue *et al.,* 2016) and *Vitis vinifera* (Rattanakon *et al.,* 2016). Organ-specific DEG were underlined in droughted species, especially those related to drought signals and transduction (Cohen *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2015). In addition, huge differences in transcription factor abundances were detected among organs suggesting that transcriptional reprogramming during drought could be organ-specific (Fu *et al.,* 2016). In wheat, it has been shown that ABA production was greater in leaves than in roots (Liu *et al.,* 2015) and that these two organs possessed their own

ABA-responding transcripts set (Rattanakon *et al.,* 2016). Despite the development of new sequencing techniques, drought effects on physiological regulations on tissue scale were poorly understood and deserved more attention.

Populus nigra, considered as mesohygrophilous species (Isebrands and Richardson 2014), was known to be particularly affected by water deficit according a large range of phenotypic and transcriptional plasticity (Bréda *et al.,* 2006; Viger *et al.,* 2016) providing some potential molecular regulations differences between tissues. Impacts of progressive water deficit on leaves were monitored by physiological, growth, developmental and anatomical measurements.

To our knowledge, no leaf tissue-specific transcriptional studies explored the impacts of water deficit on cellular reprogramming, which could bring major clues in water fluxes regulations. A comparative analysis was performed on whole transcriptional responses of midrib and leaf blade from trees subjected to severe drought to elucidate specific gene expression patterns among leaf tissues. Special attention is paid to aquaporins, proteins known for their involvement in modulation of water flow.

Material and Methods

Plant material and experimental design

Six *Populus nigra* genotypes (ALL29, ERS05, SPM12, SPM28, SPM40 and STR10) with contrasted geographical origin and drought responses (see Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, submitted article), were kindly provided by the national collection of Guéméné-Penfao (UR 0588 AGPF and UE GBFOR at the INRA"s Val-de-Loire station). Eight un-rooted cuttings (30 cm) per genotype were grown in 25 L pots (⅓ black peat and ⅔ local Limagne topsoil) under well-watered conditions (2 L per day) in the common garden of Université Clermont Auvergne from Clermont-Ferrand (45.76 N, 3.12 E). Two-years-old trees (769 ± 36 leaves) were 1.5 m spaced on fully randomized block and border effects were limited using remaining black poplar clones from the different genotypes. Poplar architecture was composed of sylleptic and proleptic branches (Hallé *et al.,* 1978; Ceulemans *et al.,* 1990; Wu and Hinckley, 2001). At the beginning of the experiment, apical buds of the proleptic shoots (named new branches) emerging from the longest older sylleptic branch (named main branch) were marked to identify leaves grown during the experiment. Pots of individual of each genotype were covered by plastic bag to prevent rehydration by dew or rain. Then, drought

was applied by withholding water to reach a predawn leaf water potential of -2 MPa considered as a severe drought (Marron *et al.,* 2003; Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, in press). Soil water deficit was monitored every day by weighting pots (mean water loss of 2.7% ± 0.3 per day and per pot). On average, ten days per trees, 8 days for STR-10 and 11 days for SPM-28, were enough to reach these conditions.

Leaf physiology

All physiological traits were monitored daily on fully expanded rank-five leaves. Predawn and midday leaf water potential (Ψ_{pd} and Ψ_{md}, MPa) were measured from 04:00 to 05:00 a.m. (before sunrise) and from 12:30 to 13:00 p.m. respectively using a Scholander pressure chamber (Model 600, PMS Instrument Company, USA). Leaves were weighted after Ψ measurements (fresh Weight, W, mg) and after four hours of rehydration in distilled water (Turgid Weight, TW, mg). Leaves were dried four days at 60°C to obtain Sample Dry Weight (DW, mg). Predawn and midday Relative Water Content (RWC, %) were estimated as: RWC = [(W-DW) / (TW-DW)] x 100 (Weatherley 1970).

Stomatal conductance (gs, mmol m^{-2} s^{-1}) was measured from 11:00 to 12:00 a.m. using a LI-1600 Steady State Porometer (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). At the same time, net carbon assimilation (A, µmol m^{-2} s^{-1}) and intrinsic stomatal conductance (gs_i) were measured using a LI-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) with fixed parameters (Photosynthetically Active Radiation = 1500 µmol m^{-2} s^{-1}, $[CO_2]$ = 350 µmol mol^{-1}).

Shoot growth

Leaf area (A_r, mm²) was determined from scanned images using ImageJ software (Schneider *et al.,* 2012; version 1.48). Specific Leaf Area (SLA, mm^{-2} mg^{-1}) was then calculated as: SLA = A_r / DW.

The number of new leaves produced during the drought experiment (N) was counted at the end of the experiment. The evolution of total leaves tree number (T, %) was estimated by the difference of total leaves number before and after the drought

Radial (Rd, mm) and longitudinal (L, cm) growths were estimated by measuring the difference of main branch diameter and new branch length between the first and the last day of the experiment.

Leaf anatomy

Veins and tissues covering were estimated on one rank-four leaf per tree growing during the progressive drought period. Fresh leaves were scanned, discolored under stirring with 1M KOH solution, and stained 30 seconds with 0.5% toluidine blue. Pictures were taken under microscope ZEISS Axioplan 2 with AxioCamHRc camera. They were analyzed using ImageJ software to compute every one to six veins order (i = 1 to 6) length (L_i, mm) and width (W_i, mm) related to specific area (A_i). Each vein covering related to leaf area (C, %) was calculated as:

$C = (\sum L_i W_i) / A_i$

The same samples were used to estimate above leaf stomatal density (D, number mm^{-2}):

$D = N_{stom} / A_{stom}$

where N_{stom} is the stomatal number measured on three surfaces of the leaf and A_{stom} the total measured leaf area equal to 1.2 mm².

Five cuttings of fresh leaf midrib were fixed in Formaldehyde Acid Acetic (FAA) using vacuum chamber during 30 min at 4°C, then they were stored 8 h in FAA. Cuttings were dehydrated by successive ethanol baths then stored in pure ethanol during 8 h at 4°C. Tissues were gradually infiltrated with LR-White resin at 4°C. The last pure resin bath was renewed two times for 8 h at 4°C. Cuttings were enclosed with pure resin in capsules and dried 24 h at 55°C (Ayer-Le Lièvre, 1992).

Cross sections of 2 µm width Microtome, which were stained with 0.5% toluidine blue for 30 seconds. Pictures were performed with an optical microscope (ZEISS Axioplan 2 with AxioCamHRc camera) and combined using MosaicJ plugin (Thévenaz and Unser, 2007). Palissadic parenchyma (Cp, %), spongy parenchyma (Cs, %), intermediate layers (Ci, %) and lacuna (Lac, %) covering were calculated related to cross section area (A_{sec}, mm²) as: $C = S_x / A_{sec}$ where S_x is tissue or lacuna surfaces measured manually.

RNA extraction and sequencing

When drought was considered as severe for each tree (Ψ_{pd} = -2 MPa), three rank-four leaves per tree were sampled at midday and, midribs and leaf blades (the whole leaf without midrib) were frozen separately. Three midribs or leaf blades per tree were mixed together for RNA extraction (Wilkins *et al.,* 2009). Total RNA were extracted using an organic extraction method with ten cleaning phases (chloroform/isoamylic acid and ethanol; Chang *et al.,* 1993). RNA integrity, purity and concentration, checked with Nanodrop bioanalyzer (2 µg, 200 ng L^{-1}, RIN > 8).

RNA sequencing was performed by GeT-PlaGe platform of GenoToul (INRA-Toulouse, France) following standard Illumina procedure for library preparation and multiplex sequencing. Whole RNA were randomly fragmented, then inserted in libraries and sequenced using Illumina HiSeq 3000 to obtain paired-end reads of 150 bp. On average, 16,171,904 paired-end reads were obtained over 24 samples (Supplementary Table 1).

Cleaning of raw short reads

Sequences were treated using a high throughput data treatment procedure implemented on GenoToul parallel calculation cluster facility (INRA-Toulouse, France). Short reads were filtered according the following criteria: vector/primers sequences were removed using TagCleaner 0.16 program (Schmieder *et al.,* 2010); anonymous nucleotides (N) were discarded keeping information only from the longest N-free sequence; poly-A were removed from short read ends; short reads less than 60 bp were discarded; short reads with low complexity, based on above 30% Lempel-Ziv-Welch (Welch 1984) compressibility, were filtered out; short reads originating from contaminating sequences (SeqTrimNext; Falgueras *et al.,* 2010) were discarded; and finally short reads were reappaired for subsequent mapping. On average, 0.3% (from 0.1% to 1.7% per tree) of paired-end short reads was removed from raw data (Supplementary Table 1). Mapping on the 73,013 reference transcripts from *Populus trichocarpa* transcriptome (Tuskan *et al.,* 2004) was performed using BWA 0.7.12 program (Li and Durbin 2010), parameterized with a maximum of 1% divergence. On average, 84% (from 82% to 86% per tree) of cleaned paired-end short reads mapped onto poplar reference transcriptome.

Differential expression analysis of transcripts

Differentially Expressed Genes (DEG) were detected from mapping counts using the DESeq2 package (Love *et al.,* 2014), version 1.10.1 in the R environment (R core Team 2016, version 3.3). Distribution of mapping counts was normalized using a Variance Stabilizing Transformation (VST). A Principal Component Analysis (PCA) was performed to explore the treatment effect (drought, well-watered) using FactoMineR package (Lê *et al.,* 2008, Husson *et al.,* 2016; version 1.32) on all samples and all transcripts using VST counts. Differentially expressed transcripts detected by DESeq2 was controlled at a False Discovery Rate (FDR; Benjamini and Hochberg, 1995) of 0.1‰, limiting the probability to no more than one false-positive gene per up- or down-regulated gene list.

Poplar transcripts annotations and Gene Ontology (GO) assignations

Reference *Populus trichocarpa* genome database (Phytozome, Goodstein *et al.,* 2012; version 3) contained 73,013 poplar transcripts which were re-annotated using Blast2GO (Gotz *et al.,* 2008, version 3.1.3) with these parameters: BLASTp performed against NCBI non-redundant database using QBlast-NCBI server with BLAST E-value $<10^{-3}$; word size of 3; low complexity filter enabled and HSP length cutoff set at 33. A full InterProScan analysis was then performed along with a GO terms mapping with GO weight of 5 or more and an E-value hit filter set at $<10^{-6}$.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Cellular functions affected by drought were identified using GSEA. Differentially expressed transcripts lists were compared to *P. trichocarpa* transcripts reference list to determine whether genes are over- or under-represented in the studied list. Chi-square was performed to compare observed and expected transcripts abundances and *P*-values were adjusted with a Benjamini-Yekutieli correction (FDR = 0.01; Benjamini and Yekutieli, 2001). The relative proportion of non-redundant functional categories was estimated using REVIGO software (Supek *et al.,* 2011).

Statistical analysis of transcriptional patterns from midrib and leaf blade

R environment (R core Team 2016, version 3.3) was used to perform statistics with $\alpha = 0.05$. Differentially expressed transcripts common to the two data sets were clustered using Kmedoid method („WeightedCluster" package). Cluster number was estimated from 2 to 20 medoids using euclidean distance and Partitioning Around Medoids algorithm. The evolution of the two indexes, Point Biserial Correlation and Average Silhouette Width, indicated the number of clusters maximizing inter-class variance. Then, transcripts lists corresponding to clusters were subjected to GSEA analysis.

Physiological, growth and anatomical statistical analysis

Statistical analyses were performed using R environment (R core Team 2016, version 3.3) with $\alpha = 0.05$. Two-way ANOVA with repeated measures were performed on physiological traits measured daily during progressive drought (weight loss, Ψpd, Ψmd, gs, RWCpd, RWCmd and A). Traits related to leaf physiology, shoot growth and leaf anatomy were analyzed by two-way ANOVA to test genotype and treatment effects.

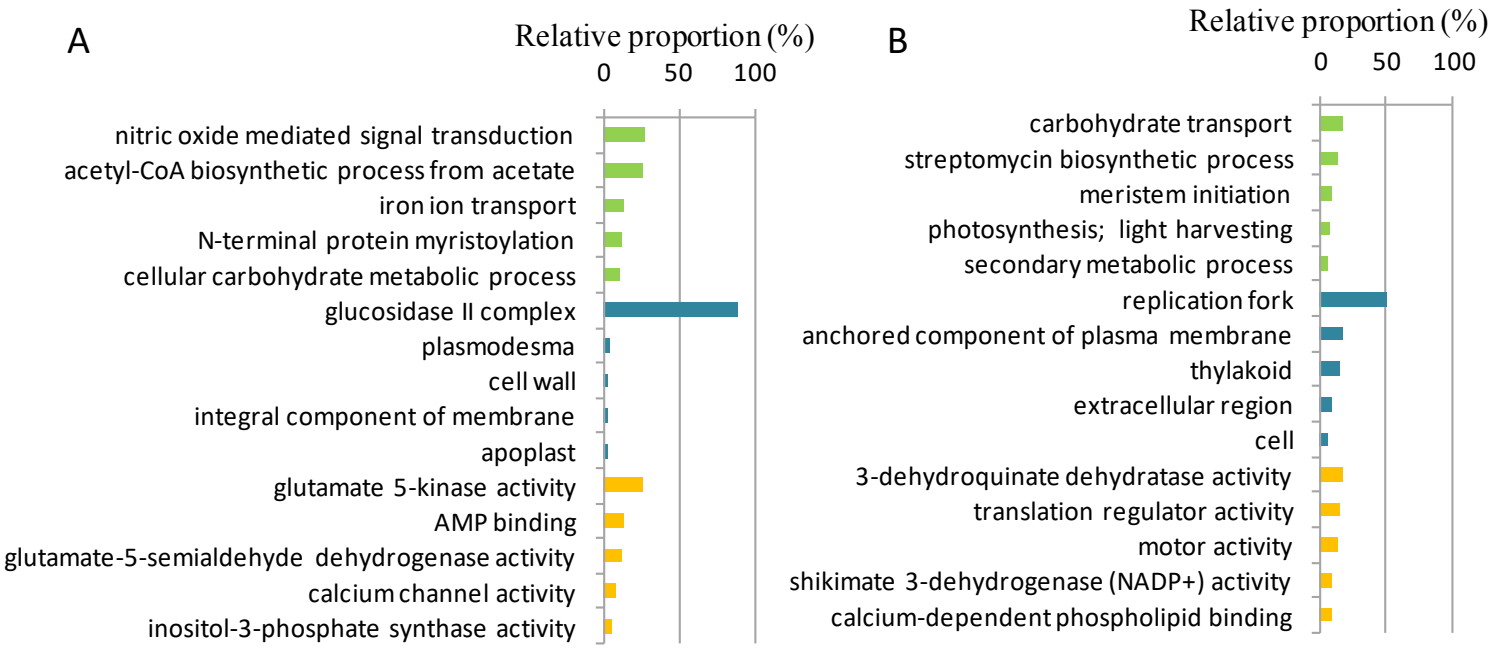


Figure 1. The five most represented functional categories among Differentially Expressed Genes found in black poplar midrib subjected to severe drought. Relative proportion of Gene Ontology was estimated for (A) up-regulated and (B) down-regulated transcripts. Biological process (green bars), cellular component (blue bars) and molecular function (orange bars) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limited by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels. The first five categories are shown.

Results and Discussion

Populus nigra genotypes were subjected to water withholding until each tree reached a severe drought (Ψ_{pd}= -2.0 ± 0.1 MPa). The experiment highlighted a continuum of physiological responses to drought among the tested black poplar genotypes. Five of them were close to drought avoidance characterized by a stop in carbon assimilation, growth and development, and had a mid to high phenotypic plasticity although one was more tolerant by maintaining mature leaf and leaf development and was associated with the lowest plasticity (Garavillon-Tournayre *et al.,* 2017, submitted article). Leaf transcriptome analyzed by RNAseq, revealed deep remodeling of genes expression in response to severe drought. Among the 41% differentially expressed transcripts those coding for proteins involved in signaling pathways, detoxification and cellular homeostasis functions were identified. However, other crucial cellular functions changed, such as cellular movements, membranes integrity and water fluxes regulations. Transcripts expressions coding aquaporins and SNARE interacting with vesicular transport pathway were particularly impacted by drought.

Midrib transcriptome is modulated in response to drought

High quality reads provided from *Populus nigra* midrib samples were aligned and mapped on *Populus trichocarpa* transcriptome. 61,013 transcripts were identified compared to 73,013 transcripts of the reference. Sequences were analyzed according to drought treatment factor and revealed 6,552 up-regulated and 6,045 down-regulated transcripts with a False Discovery Rate of 0.1‰. This suggested that around 20.6% of midrib transcriptome was modulated under severe drought conditions.

Functions of differentially expressed transcripts were determined using Gene Set Enrichment Analysis (Figure 1). Numerous up-regulated transcripts (Figure 1A) belonged to acetyl-CoA biosynthesis from acetate (GO:0019427). Acetyl-CoA is involved in primary and secondary metabolisms and especially fatty acids (Ke *et al.,* 2000; Xiao and Chye, 2011), cysteine (Noji *et al.,* 1998) and flavonoids (Graham, 1998) biosynthesis. The process of acetyl-CoA biosynthesis is not well-known but acetate, one of its precursor, was particularly localized in plastids for fatty acids production (Smirnov, 1960; Lin and Oliver, 2008). This result suggested that water stress induced cellular membranes huge restructuration. In addition, iron ion transport (GO:0006826) was particularly stimulated under drought. Iron ions cellular homeostasis is finely regulated because of their high toxicity. These ions are also essential in mitochondria and chloroplast metabolisms (Morrissey and Guerinot, 2009). They moved from roots to leaves using transpiration stream, then are mainly accumulated into

thylakoids where they are used as cofactor of enzymes favoring electron transport (Jain and Connolly, 2013; Vigani *et al.,* 2013). We suspected that in our experiment, iron transport was improved to sustain primary metabolism in leaves growing drought. N-terminal protein myristoylation (GO:0006499; Aitken *et al.,* 1982) were numerous in our drought conditions. These modifications could improve protein-membrane interactions, signal transduction (Hurst and Hemsley, 2015) and modify functionality of molecules, such as thioredoxin (Traverso *et al.,* 2013) and calcium-dependent protein kinase (Martín and Busconi, 2000).

Signaling pathways have been activated, because we found many up regulated transcripts belonging to signal transduction using nitric oxide (GO:0007263). Nitric oxide is involved in two complementary pathways: synthesis of anti-oxidants targeting Reactive Oxygen Species (ROS) produced during drought (Sang *et al.,* 2008) and biosynthesis of Reactive Nitrogen Species into mitochondria, other primary signaling molecules similar to ROS (Gupta *et al.,* 2011; Vanlerberghe, 2013). Nitric oxide could also control part of ABA-dependent stomatal closure (Neill *et al.,* 2008). Another important way to improve drought signal transduction (Rosa *et al.,* 2009) and cellular homeostasis (Hare *et al.,* 1998; Krasensky and Jonak, 2012) might be sugar-sensing using cellular carbohydrate metabolism (GO:0044262). Our leaves samples could be considered as source tissues providing soluble sugars for other organs regarding the Münch hypothesis (Münch, 1930; Knoblauch and Peters, 2010). However, both source and sink strength should be reduced under our drought conditions because net photosynthesis and growth parameters were low. In addition, Ψ_{pd} and gs were very low suggesting that water tension in plant was high. This could reduce phloem dilution, increase viscosity and slow down phloem transport (Sevanto, 2014). As observed in *Pinus edulis* under extreme, short and fast drought, trees had no access to their carbon resources to compensate photosynthesis loss and maintain phloem flux (Sevanto *et al.,* 2014). It has been shown that accumulation of carbohydrates improved cellular homeostasis under drought in poplar species (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Cao *et al.,* 2013; Viger *et al,.* 2016). Besides, a decrease of osmotic potentials differences between source and sink organs has been observed suggesting that solutes were accumulated in sink (Ruehr *et al.,* 2009). Sugar accumulation could sustain growth of young leaves before a drastic drop of photosynthesis (McDowell and Sevanto, 2010).

Endoplasmic reticulum play a central role in growth sustaining, with Glucosidase II enzymatic complex (GO:0017177). This complex parts of the calnexin cycle that allows the retention of glycoproteins into the endoplasmic reticulum (Moremen and Molinari, 2006). This enzyme removes two glucoses linked to a glycoprotein allowing its folding (Moremen

and Molinari, 2006; Soussillane *et al.,* 2009). This shape is essential for protein proceeding through the secretory pathway. For these reasons, GII is considered as a checkpoint of glycoprotein folding quality control during deglucosilation/reglucosilation cycles (Ellgaard and Helenius, 2003). Proline-rich glycoproteins might be accumulated during drought stress as supported by the accumulation of glutamate 5-kinase (GO:0004349) and glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase (GO:0004350), enzymes involved in proline biosynthesis (Singh Gujjar *et al.,* 2014). Proline-rich glycoproteins accumulation under drought conditions could improve modifications of cell wall components (Covarrubias *et al.,* 1995). In consequence, they may preserve cellular structure integrity, favor interaction on cell surface and participate to stress defenses (Kavi Kishor, 2015). Such glycoproteins have been identified in phloem of *Phaseolus vulgaris* subjected to water deficit (Battaglia *et al.,* 2007). Proline is also commonly accumulated in Angiosperms subjected to drought (Choudhary *et al.,* 2005; Cocozza *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2011; Liu *et al.,* 2015; Hamanishi *et al.,* 2015) as observed in phloem sap of *Arabidopsis* leaves subjected to water deficit (Mewis *et al.,* 2012) to preserve cellular homeostasis and to neutralize ROS (Szabados and Savouré, 2010). In addition, AMP-binding (GO:0016208) was activated in our droughted trees as already observed in grass and sorghum subjected to water deficit (Meyer *et al.,* 2014; Fracasso *et al.,* 2016). AMP-binding was related to energy influx, carbon use, fatty acid with acetyl-CoA (Ke *et al.,* 2000) and fatty acid turn-over of membrane lipids (Poirier *et al.,* 2006; Zhu and Xiong, 2013). Inositol-3-phosphate synthase (GO:0004512), also called myo-inositol-1-phosphate synthase is particularly expressed under our drought conditions, constituted a key enzyme in inositol synthesis (Abreu and Aragao, 2006). This metabolism belongs to the numerous cellular carbohydrate metabolisms found over-represented in our experiment. Overexpression of this gene in sweet potato improved drought tolerance with an accumulation of calcium, abscissique acid (ABA), proline and trehalose, and a decrease of H_2O_2 concentration (Zhai *et al.,* 2016), suggesting a role in ROS scavenging. These results were supported by a high activity of calcium channel (GO:0005262), calcium being an important secondary messenger implicated in drought signaling (Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Nawaz *et al.,* 2014).

Cellular functions of down-regulated transcripts were analyzed using GSEA (Figure 1B). The most over-represented process was the carbohydrate transport (GO:0008643) suggesting that transcripts related to carbohydrates metabolisms encode molecules that could be sequestrated into veins cells such as phloem cells. In addition, endocytose activity provided from motor activity (GO:0003774; Marks *et al.,* 2001) in plasma membrane (GO:0046658) was also reduced. These results corroborated the hypothesis that carbohydrates could be

sequestrated into phloem cells and adjoining tissues in response to a decrease of osmotic potential gradient between source and sink organs which depends on the water potential into xylem vessels (Ruehr *et al.,* 2009; Sevanto *et al.,* 2014). Such solutes and carbohydrate accumulation could increase the osmotic potential in phloem generating water movements from xylem to phloem thereby improving phloem sap flow (McDowell 2011; Lemoine *et al.,* 2013). It have been shown that the accumulation of carbohydrates could accelerate the decrease of photosynthesis and precocious senescence (Dai *et al.,* 1999). This was supported by the down-regulation of transcripts involved in photosynthesis and light harvesting (GO:0009765) occurring in thylakoids (GO:0009579).

The diversity of the functions attributed to the molecules qualified of secondary compounds leads to controversial results. For example, terpenoids and phenolic families concentrations are reduced or increased depending on intensity and drought speed (Yani *et al.,* 1993; Blanch *et al.,* 2009; Marchese *et al.,* 2010; McKiernan *et al.,* 2014; Niinemets 2015). In addition, shikimic acid (GO:0004764; GO:0003855), precursor of secondary metabolites of macrocarpals, lignin (Brown and Neish, 1955), amino acids (Bochkov *et al.,* 2012) and salicylic acid (Khan *et al.,* 2015), was particularly down-regulated in our droughted black poplar, as already found in *Eucalyptus* (McKiernan *et al.,* 2015) and *Populus balsamifera* (Hamanishi *et al.,* 2015) subjected to water deficit. However, the direct involvement of shikimic acid in drought responses was unfortunately not well described. The reduction of transcription concerned annexin (GO:0005544) anchored in plasma membrane (GO:0046658). These calcium-dependant phospholipids involved in light signaling, could interact with MAPK signaling but their function during drought were relatively unknown (Baucher *et al.,* 2012). As a consequence, carbon fixation was expected to be reduced as proved by the decrease in photosynthesis. This result was commonly observed in droughted plants (Thomas and Eamus, 1999; Cornic, 2000; Monclus *et al.,* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Feller, 2016). Transcripts involved in secondary metabolic processes (GO:0019748) were particularly down-regulated in our drought conditions.

The studied black poplars were strongly affected by drought with the down-regulation of some transcripts involved in meristem initiation (GO:0010014), suggesting that growth and development by cell differentiation were repressed. This was supported by the major function of cellular component: replication fork (GO:0005657) essential for DNA double-strands separation during replication. This suggested that replication and mitosis were largely inhibited in veins of black poplars subjected to drought. In addition, transcripts related to translation regulation (GO:0045182) were down-regulated. These results were supported by

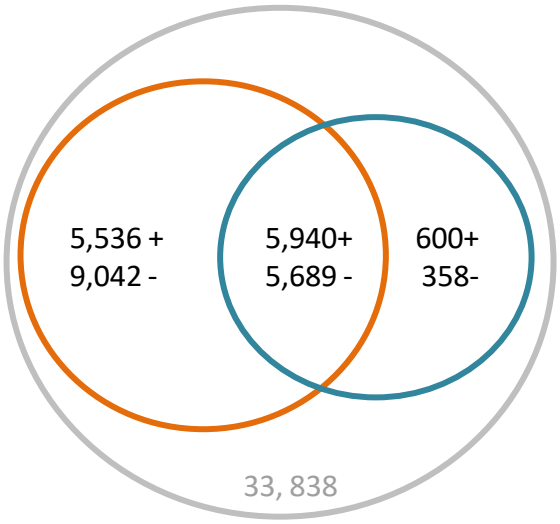


Figure 2. Venn diagram showing the number of differentially expressed transcripts in black poplar leaf blade (orange circle) and midrib (blue circle). Transcripts were either up-regulated (plus sign), down-regulated (minus sign) or non-differentially expressed (grey) in leaves tissues.

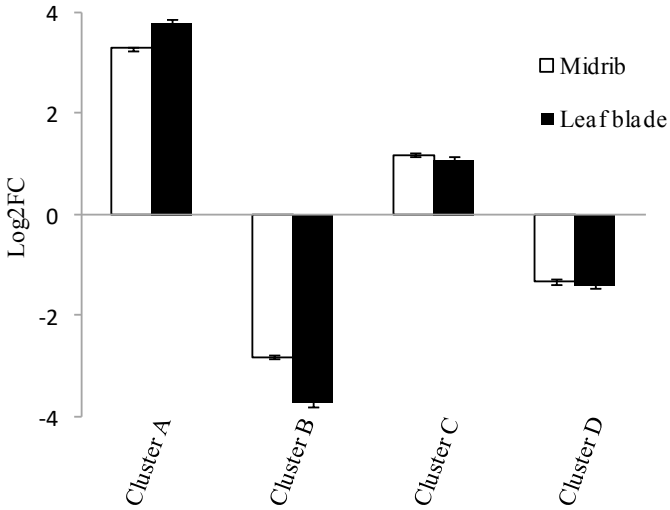


Figure 3. Mean (± SE) differential expression (log2 Fold change) of transcripts grouped in four clusters (A, B, C, D) according to their pattern expression in midrib and leaf blade. Four clusters were building around four significantly different medoids (Kmedoid method).

the decrease of shoot growth, leaf development and particular leaf anatomical modifications affected by drought in newly formed leaves, as observed in other species (*e.g.* Lecoeur *et al.,* 1995; Berta *et al.,* 2010; Anjum *et al.,* 2011; Avramova *et al.,* 2015).

A non-expected biological process emerged from our results and concerned the Streptomycin biosynthetic process (GO:0019872). It was also activated although this antibiotic is synthesized by Streptomycetes as *Streptomyces griseus* (Distler *et al.,* 1992). Streptomyces species were ubiquitous of a wide-range of soil types and many of them lived in symbiosis with plants and improve nutrient assimilation of plants, their growth and their resistance to biotic stress thanks to biosynthesis of auxin and antimicrobials compounds (Seipke *et al.,* 2012). Evidence of horizontal gene transfers among Streptomycetes species for Streptomycin resistance gene were found (Tolba *et al.,* 2002). Finally, our results showed that midrib transcriptome was remodeled in response to drought to promote stress signaling, cell wall restructuration and cellular homeostasis thanks to carbohydrates and solutes accumulation.

Common Differentially Expressed Genes of midrib and leaf blade have almost similar expression patterns

We explored the transcriptional regulations of transcripts along the midrib and leaf blade tissues. 11,639 differentially expressed genes (DEG) in response to drought are shared by the two leaf compartments (Figure 2). Their expression patterns were analyzed using Kmedoids clustering. Four significantly different clusters maximizing intra-cluster variance were found (Figure 3). The cluster A gathered 1,854 up-regulated transcripts. Their expression level was the highest of the four clusters with a Fold Change (Log2FC) close to 3.3 in midrib and 3.8 in leaf blade. Transcripts, which were the more down-regulated in the two compartments (-2.8 fold in midrib and -3.7 in leaf blade), clustered together (cluster B, 2,075 transcripts). Intermediate responses were found in cluster C (4,086 transcripts), containing relatively low up-regulated transcripts (1.2 fold in midrib and leaf blade), and cluster D (3,614 transcripts), low down-regulated transcripts (-1.3 and -1.4 fold in midrib and leaf blade respectively). In response to our severe drought conditions, the differentially expressed transcripts followed similar tendencies of expression level among the two leaf compartments. In addition, mean expression levels of common DEG were higher in leaf blade than in midrib. Leaf blade contained numerous tissues with potential differences in their transcriptional regulation, deserving more attention.

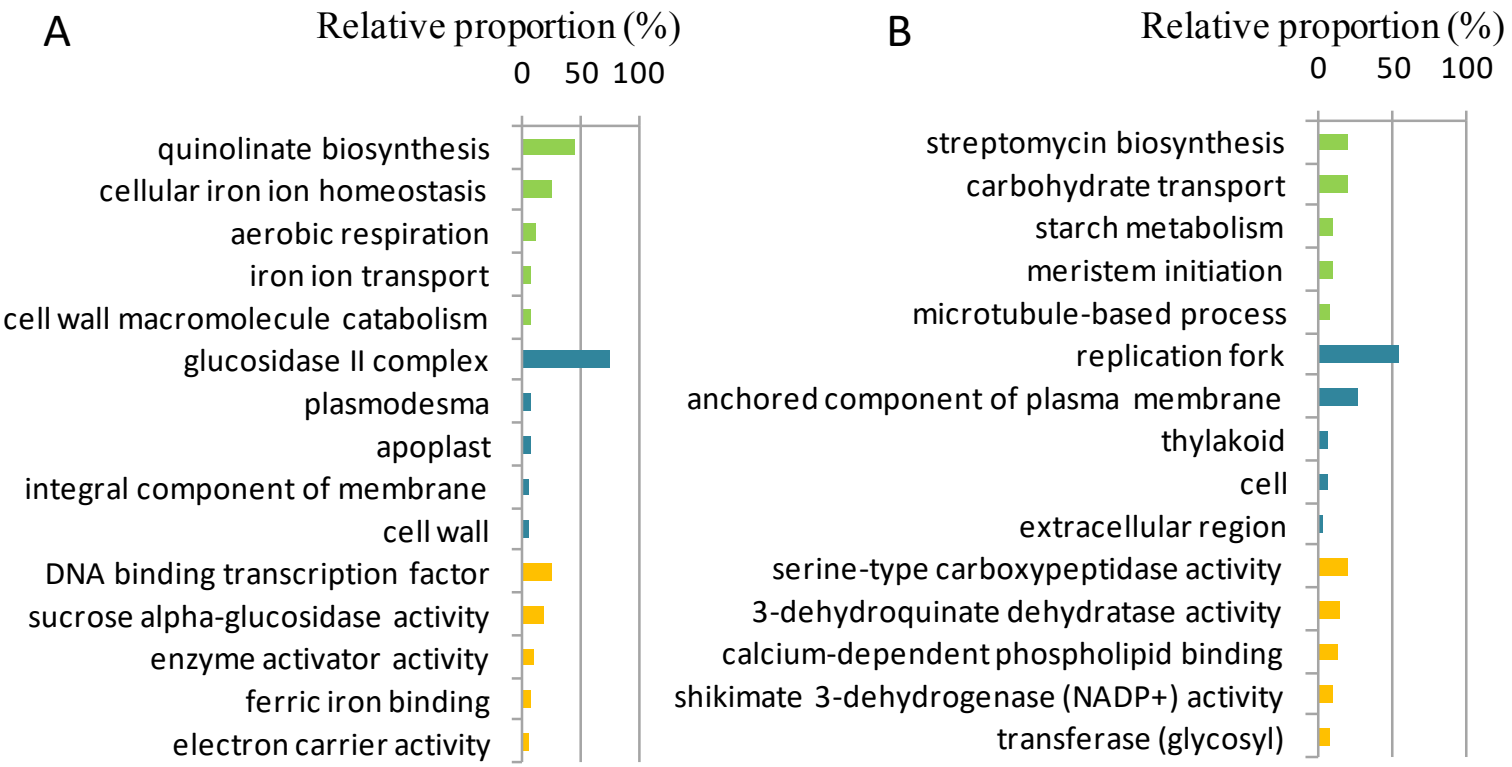


Figure 4. The five most represented functional categories among Differentially Expressed Genes found in leaf blade midrib and leaf blade of black poplar subjected to severe drought. Relative proportion of Gene Ontology was estimated for (A) up-regulated and (B) down-regulated transcripts. Biological process (green bars), cellular component (blue bars) and molecular function (orange bars) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels. The first five categories are shown.

The most up-regulated transcripts among the two compartments (Figure 4A) concerned specific functions as quinolate biosynthesis (GO:0019805), cellular iron ion homeostasis (GO:0006879) and aerobic respiration (GO:0009060). They were respectively related to NAD biosynthesis involved in oxidation-reduction reactions in plastids (Katoh 2006), cofactor of enzymes involved in electron transport mainly in thylakoids (Jain and Connolly, 2013; Vigani *et al.,* 2013), and energy provided mainly from carbohydrates (Lambers *et al.,* 1998). These modulations were common plant responses to drought to maintain energy biosynthesis (Pinheiro and Chaves, 2011). Up-regulated transcripts were mainly related to Glucosidase II complex (GO:0017177), involved in quality control of glycoproteins to promote their secretion in the Golgi system.

Many of the cellular functions related to the most down-regulated transcripts (Figure 4B) referred to streptomycin biosynthesis (GO:0019872), carbohydrate transport (GO:0008643) and starch metabolism (GO:0005982) involved in defense reactions (Seipke *et al.,* 2012), osmotic adjustments by keeping solutes in the midrib cells (McDowell 2011; Lemoine *et al.,* 2013), and a decrease of storage sugars in consequence of the reduction of carbon assimilation and osmotic adjustment which should decrease embolism (Regier *et al.,* 2009; Nardini *et al.,* 2011; Secchi and Zwieniecki, 2011; Cao *et al.,* 2013).

Whereas almost all DEG followed the same expression pattern, only two transcripts highlighted leaf compartment-specific transcriptional activity during drought: 3-n-debenzoyl-2-deoxytaxol (Potri.006G010300.1) and Class V Chitinase (Potri.006G188300.1). These transcripts were found up-regulated (5.2 and 2.3 fold) in midrib and down-regulated (-2.1 and -1.6 fold) in leaf blade (data not shown). Taxol biosynthesis, including a step of acyl group transfer (GO:0016747) executed by the first molecule, is stimulated in *Taxus media* shoots during a drought experiment and could be subjected to the ABA-dependant pathway (Hoffman, 1999). Taxol and other taxanes products reduced the dynamics of the microtubules by blocking their disassembly and impairing reorientation (Nick, 2013). This suggested that high taxol concentration in midrib could build more stable microtubules thereby preventing drought adaptive responses in many plant species (Nick, 2013).

Class V Chitinase responding to abiotic stimulus (G0:0009628) was up-regulated in our experiment, as already observed in cambium and leaves of *Populus* species subjected to water deficit (Berta *et al.,* 2010), Cohen *et al.,* 2010; Zhang *et al.,* 2014) and in coffee shoots (Mofatto *et al.,* 2016). Such chitinase, that can be induced by ABA (Ohnuma *et al.,* 2011), possessed transglucosylase activity allowing transfer of glucose segments to specific target for cell wall destruction (Kasprzewska, 2003), cellulose biosynthesis modifications (Wang *et al.,*

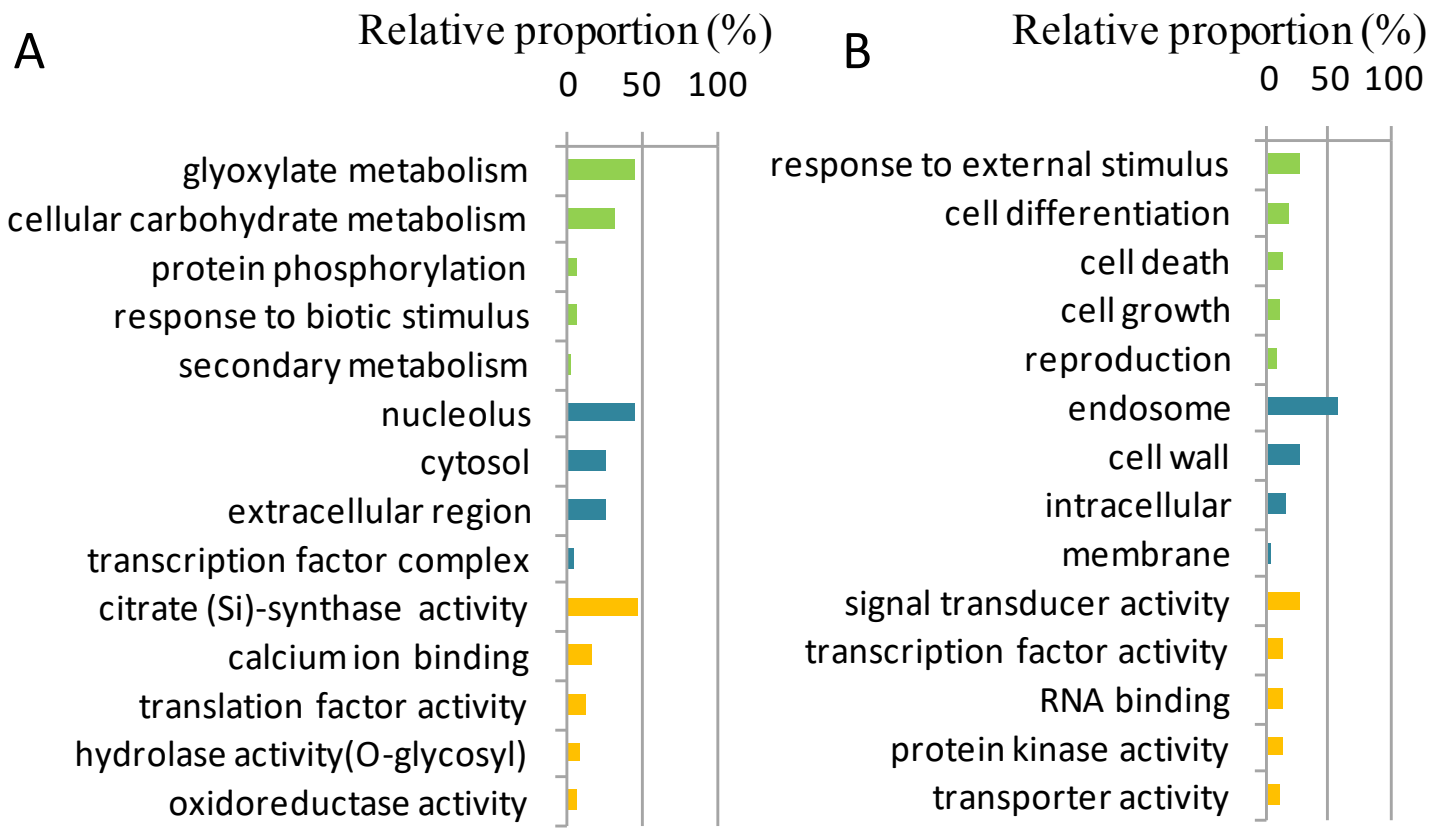


Figure 5. The five most represented functional categories among Differentially Expressed Genes only found in midrib of black poplars subjected to severe drought. Relative proportion of Gene Ontology was estimated for (A) up-regulated and (B) down-regulated transcripts. Biological process (green bars), cellular component (blue bars) and molecular function (orange bars) were significantly over-represented (*P*-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels. The first five categories are shown.

2016) and turgor loss regulation (Bray, 2004). We suspected that in drought conditions, chitinase V induced cell wall remodelling in midrib but not in leaf blade that could limit collapse.

Midrib-specific transcriptional responses to drought

958 transcripts were specifically and differentially expressed in midrib: 600 were up-regulated and 358 were down-regulated (Figure 2). Among over-represented and non-redundant cellular functions midrib-specific up-regulated transcripts, a large part referred to glyoxylate metabolism (GO:0046487; Figure 5A). Glyoxylate is the product of glycolate oxidation in peroxisomes. It accumulate in droughted leaves during photorespiration (Aprile *et al.,* 2013; Chen *et al.,* 2013). This compound was suspected to oxidize membrane lipids, influence transcription and modify proteins (Weber *et al.,* 2004; Kotchoni *et al.,* 2006). In addition, glyoxylate cycle contains three enzymes belonging to Krebs cycle, especially citrate synthase (GO:0004108) whose products under drought favored glycerate-3-phosphate synthesis which entered into Calvin cycle for sugar production (Nakamura and Tolbert, 1983; Kunze *et al.,* 2006; Allan *et al.,* 2009). Numerous protein phosphorylations (GO:0006468) were essential during glyoxylate cycle as supported by over-representation of this function up-regulated transcripts. The high oxido-reductase activity (GO:0016491) and carbohydrate metabolism (GO:0044262) were consistent with the hypothesis of photorespiration stimulation and the accumulation of sugars to maintain cellular homeostasis under drought. Modifications of carbohydrate metabolism was consistent with the activation of glucoside hydrolase (GO:0004553) in our drought conditions. This enzyme could be involved in cell wall polysaccharide pathway, the mobilization of energy, symbiosis, signaling and secondary metabolism (Bray 2004; Minic 2008). Some transcripts from secondary metabolism (GO:0019748) were effectively up-regulated in midrib after drought treatment. Secondary metabolites (such as anthocyanins, terpenes, phenols, tannins) synthesized during drought were mainly associated with ROS scavengers, anti-oxidant and signal transducers (for example Blanch *et al.,* 2009; Marchese *et al.,* 2010; Ramakrishnan and Ravishankar, 2011; McKiernan *et al.,* 2015; Niinemets, 2015).

High activity of transcripts involved in response to biotic stimulus (GO:0009607) can be found in our experiment suggesting a role for symbiots, such as streptomycetes, in drought tolerance. Fungal and bacterial symbiosis can improve osmotic adjustments, water use efficiency, antioxidant production, or water fluxes regulations (Marjanović *et al.,* 2005; Singh *et al.,* 2011). Transcriptional changes in nucleolus (GO:0005730), using transcription and

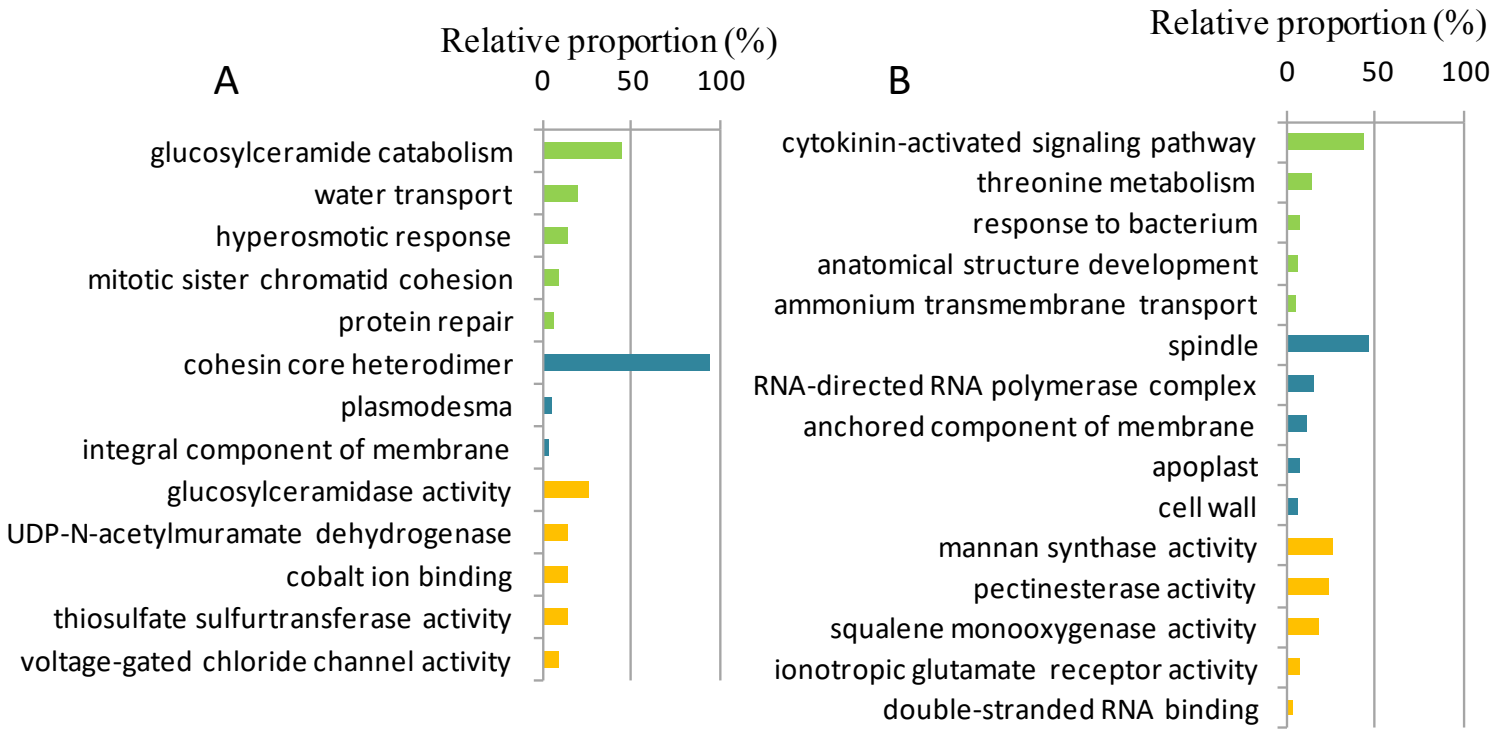


Figure 6. The five most represented functional categories among Differentially Expressed Genes only found in leaf blade of black poplars subjected to severe drought. Relative proportion of Gene Ontology was estimated for (A) up-regulated and (B) down-regulated transcripts. Biological process (green bars), cellular component (blue bars) and molecular function (orange bars) were significantly over-represented (P-value < 0.05) in data sets. Redundancy was limiting by using REVIGO software. Relative proportion of each GO was estimated on their representation levels. The first five categories are shown.

translational factors (GO:0005667, GO:0008135) and signaling through the calcium as secondary messenger (GO:0005509) supported other transcription modifications observed in under our drought conditions (Zhu, 2002; Conde *et al.,* 2011; Nick, 2013).

Midrib-specific down-regulated transcripts are mainly involved in response to external stimulus (GO:0009605), highlighting the drought effects on secretion processes, enzymes activities or gene expressions in our drought conditions (Figure 5B). Transcripts related to growth (GO:0016049) and development (GO:0030154) were especially down-regulated in midrib. These results illustrated that drought may induce a decrease of cell elongation to limit growth of leaf tissues, supporting the observed decrease of minor veins covering (Garavillon-Tournayre, unpublished results). Nevertheless, cell death (GO:0008219) was not promote in our drought conditions which proves that the tissues of the leaves formed during the water stress are still functional even under severe stress.

In addition, a precocious senescence of older leaves was observed in many black poplar genotypes, suggesting that leaf functions and regulations differed along the canopy during drought, as supported by literature (for example Marron *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Giovannelli *et al.,* 2007; Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010; Feller 2016). In the context of severe drought, transcripts involved in reproduction process (GO:0000003) were notably de-activated. We suspected that decreases in growth and development were supported by the specific decline of signal transducer (GO:0004871), transcription factor (GO:0003700, GO:0003723) and kinase (GO:0004672) activities. A great part of down-regulated transcripts was related to endosome (GO:0005768) in our experiment. . It was commonly related to vesicle recycling provided from endocytosis, protein degradation and internalization and transporter activity (GO:0005215; Otegui and Spitzer, 2008).

Transcriptional responses to drought was specific to leaf blade

5,536 up-regulated and 9,042 down-regulated transcripts were specifically expressed in leaf blade (Figure 2). Among the up-regulated transcripts (Figure 6A), the over-represented function referred to glucosylceramide catabolism (GO:0006680), supported by glucosylceramidase activity (GO:0004348). This process is involved in the degradation of membranes sphingolipids (GO:0016021), to change membranes biochemical and physical properties (Lynch and Steponkus, 1987; Warnecke and Heinz, 2003). This metabolism is linked to glutamate biosynthesis catalyzed by UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase (GO:0008762; KO:K00075). Glutamate biosynthesis was known to promote proline synthesis in response to drought (Singh Gujjar *et al.,* 2014) to maintain cellular homeostasis

(Choudhary *et al.,* 2005; Cocozza *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2015; Hamanishi *et al.,* 2015) and ROS scavenging (Szabados and Savouré, 2010). Regulations of water transport (GO:0006833) were essential in leaf blade of black poplar under drought. These regulations could be due in part to up-regulation of aquaporins (*PIP1* or *NIP1*, nomenclature from Lopez *et al.,* 2013). In addition, transcripts coding voltage-gated chloride channel (GO:0005247) were accumulated suggesting intracellular membranes depolarization allowing anion efflux (Ward *et al.,* 2009). In consequence of our severe drought, leaf water content decreased that could lead to drastic changes in cellular composition and an increase of osmotic potential triggering hyperosmotic responses (GO:0006972). As already observed in our study, this hyperosmotic stress was supported by membranes compositions changes, signal transducers, calcium-dependant kinase or proline and carbohydrates accumulation (Zhu, 2002; Boudsocq and Laurière, 2005; Cohen *et al.,* 2010; Krasensky and Jonak, 2012; Hamanishi *et al.,* 2015). In addition, we suspected that cellular detoxification and homeostasis were maintained in our drought conditions as suggested by accumulation of transcripts related to cobalt ion binding (GO:0050897), such as metallothioneins (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Kohler *et al.,* 2004; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Xue *et al.,* 2008; Cohen *et al.,* 2010), or thiosulfate sulfurtransferase (GO:0004792), called rhodanese (Bordo, 2002). These molecules could be stabilized as suggested by upregulation of transcripts related to protein repair (GO:0030091). They are protected by (LEA). This mainly referred to late embryogenesis abundant transcripts that avoid their degradation under dry conditions (Todaka *et al.,* 2015). The transcripts are commonly up- and down-regulated either in our drought conditions (Garavillon-Tournayre unpublished results) or literature (Caruso *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Timperio *et al.,* 2008; Bae *et al.,* 2009). We suspected that in dry conditions, structural stability of mesophyll cells was reduced whereas cytoplasm viscosity was increased in response to the increase of osmotic potential. Surprisingly, transcripts related to mitotic sister chromatid cohesion (GO:0007064) with cohesin core heterodimer (GO:0008280) were particularly up-regulated in drought conditions, implying mitosis perpetuation in leaf blade despite the observed low growth and development. Chromatid bounds could be stabilized thanks to microtubules synthesis which maintained cellular structure in hyperosmotic stress (Komis *et al.,* 2002; Liu *et al.,* 2013; Nick 2013).

Leaf blade specific down-regulated transcripts (Figure 6B) referred mainly to cytokinin signaling pathway (GO:0009736) that commonly reduced growth and development, increased ABA sensing and leaf senescence and preserved cell membrane integrity, (Hwang *et al.,* 2012; Griffiths *et al.,* 2014). This development inhibition was reinforced by the down-

regulation of transcripts related to anatomical structure development (GO:0048856), spindle (GO:0005819) and RNA polymerase complex (GO:0031379). Similar development modulations were observed on shoots such as a decrease of stem longitudinal growth and leaf development during drought. In addition, transcripts implied in cellulose synthesis, the major compound of cell wall (GO:0005618, GO:0048046), or in mannan synthase activity (GO:0051753; Suzuki *et al.,* 2006; Mellerowicz and Sundberg, 2008; Davis *et al.,* 2010; Verhertbruggen *et al.,* 2011) were also down regulated . Cell wall structure could be also modified by a reduced pectinesterase activity (GO:0030599), which could be related to the loss of pectin in dicot cell wall (Micheli, 2001; Houston *et al.,* 2016). Threonine metabolism (GO:0006566) was particularly deactivated in leaf blade, as already observed in *Populus balsamifera* (Hamanishi *et al.,* 2015) and was commonly assimilated to isoleucine homeostasis (Joshi *et al.,* 2010). Isoleucine was accumulated in the chloroplast under drought conditions (Joshi and Jander 2009) and was implied in stress signalling to regulate transcription and used as substrate for proteins synthesis (Nambara *et al.,* 1998). Transcriptional repression of ammonium transmembrane transport (GO:0072488) was observed during drougt stress. We suspect that in black poplar leaves subjected to drought nitrate reductase activity could be reduced. This enzyme is well known to reduce nitrate into ammonium to produce glutamate (Hsiao, 1973; Foyer *et al.,* 1998; Lawlor 2002). In addition, repression of plasma membrane channels, referring to ionotropic glutamate receptor (GO:0004970) was observed. This glutamate receptor channel is susceptible to transport general ions or amino acids and could act as a nitrogen status regulations signal and a sensor of environmental cues (Davenport 2002; Forde and Roberts, 2014). Triterpenoids are secondary metabolites which came from the squalene epoxidase activity (GO:0004506; Fukushima *et al.,* 2011). This specific down-regulation, already observed in poplar species subjected to water deficit (Berta *et al.,* 2010; Cohen *et al.,* 2010), suggested a decrease in membrane sterols, brassinosteroids and cuticular waxes production (Fukushima *et al.,* 2011; Ramakrishnan and Ravishankar, 2011; Singh and Sharma, 2015).

Other inhibited transcripts of leaf blade are particularly interesting, because they referred to bacterial responses (GO:0009617). Bacteria can promote plant growth using phytohormones production, nitrogen fixation or iron fluxes but also improve drought tolerance of plant, as observed for tomato and pepper (Mayak *et al.,* 2004), pea (Belimov *et al.,* 2009) and poplar (Wang *et al.,* 2014). We suspected that in our experiment, severe drought could modify the molecular exchanges between plants and symbiotic bacteria and limit benefits of their interaction for plant growth and water deficit tolerance.

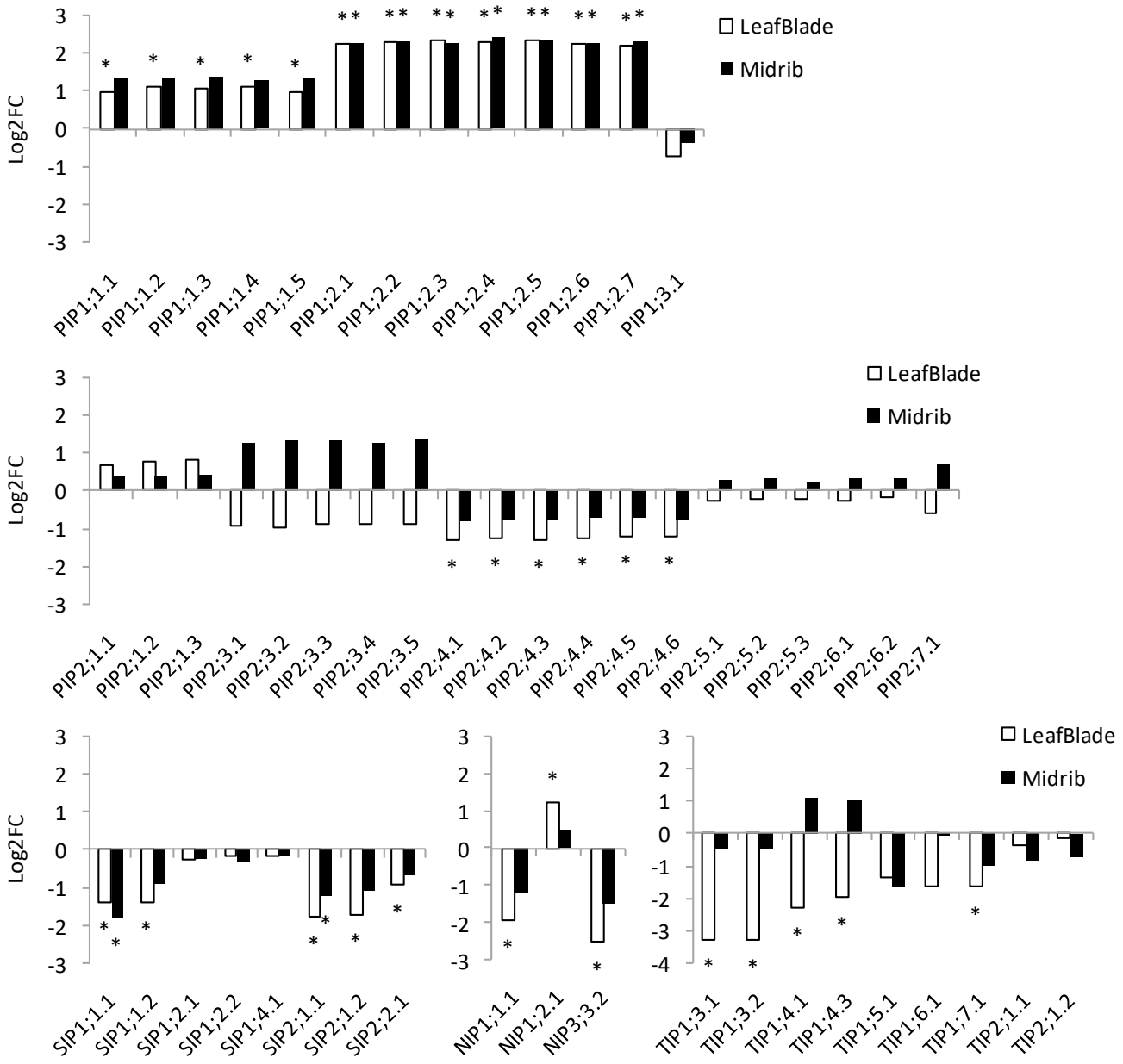


Figure 7. Differentially expressed (Log2 Fold Change) aquaporins genes in leaf blade and midrib of black poplar subjected to severe drought. Significant drought effect detected by Dseq2 for FDR = 0.1‰ was indicated using a star. Alternative transcripts results were presented. Aquaporins nomenclature provided from Lopez *et al.* (2013).

Aquaporins were differentially expressed under drought according to leaf tissue

Soil water deficit induced fluctuations in membranes permeability that could maintain cellular homeostasis, as suggested by our results and literature. Aquaporins constituted well-known channels involved in membrane permeability to water and small molecules in plants (Preston *et al.,* 1992; Maurel *et al.,* 1993; Chaumont *et al.,* 2000). Previous studies showed their tissue-specific transcriptional regulations into leaves under well-watered conditions, with high accumulation in expanding tissues such as cambium (Tyerman *et al.,* 2002; Berta *et al.,* 2010) or at the end of the elongation zone (Hachez *et al.,* 2008). Results showed abundance of *PIP1* and *PIP2;1* in mesophyll cells of rice leaf blade (Sakurai *et al.,* 2008), suggesting that aquaporins localizations depends on species and on plant physiological status (Maurel *et al.,* 2015). In our transcriptional data set, all aquaporins subfamilies transcripts except *XIP* (53 transcripts related to *PIP*, *TIP*, *SIP*, *NIP*) were expressed in midrib and leaf blade. This suggests that *XIP* genes were not or weakly expressed in black poplar leaves.

Three aquaporins genes (*PIP1;2*, *SIP1;1* and *SIP2;1*) were differentially expressed in midrib in response to drought (Figure 7). *PIP1;2* transcripts were up-regulated whereas the others were down-regulated. Over-expression of *PIP1;2* has previously been described in *Populus simonii x balsamifera* (Almeida-Rodriguez *et al.,* 2010) droughted plants. Tissue-specific transcriptional regulation of aquaporins has been shown in *Arabidopsis* leaves subjected to xylem ABA perfusion, with aquaporins repression in bundle sheath cells and no transcription changes in mesophyll cells (Shatil-Cohen *et al.,* 2011). These results encountered our findings because the three aquaporins (*PIP1;2*, *SIP1;1* and *SIP2;1*) have the same expression pattern in midrib and leaf blade. Our findings suggested that no aquaporins genes were specifically differentially expressed in midrib. However, eight genes encoding aquaporins (*PIP1;1*, *NIP1;1*, *NIP1;2*, *NIP3;3*, *PIP2;4*, *TIP1;3*, *TIP1;4* and *TIP1;7*) seemed to be regulated specifically in leaf blade (Figure 7). High expression of *PIP1;2* in midrib and leaf blade under drought could favor embolism refilling and could be a crucial contributor in leaf water transport, as observed in *Arabidopsis* (Prado *et al.,* 2013). This role is reinforced by the *PIP1* expression in poplar (Secchi and Zwieniecki, 2010; Secchi and Zwieniecki, 2014) and *Arabidopsis* stems (Martre, 2002). In addition, *PIP1* expression can improve mesophyll conductance and carbon assimilation in tobacco leaves under salt stress conditions (Sade *et al.,* 2014), a treatment that mimics partially drought stress with common hyperosmotic responses. Down-regulations of *PIP2* and *TIP* aquaporins isoforms in leaf blade were associated with intracellular trafficking (Zhang *et al.,* 2011; Hachez *et al.,* 2013; Luu and Maurel, 2013; Chevalier and Chaumont, 2015) thereby limiting water fluxes and loss through

membranes (Cochard *et al.,* 2006; Hachez *et al.,* 2008). Functions of aquaporins isoforms *SIP* and *NIP* were not well-understood in drought conditions and deserved further analysis.

Conclusions

Leaf blade and midrib transcriptomes of *Populus nigra* subjected to severe drought were compared to identify tissue specificities to cope with water deficit. Around 20% of the whole midrib transcriptome was modulated in response to severe drought compared to the 41% in leaf blade. Cellular functions modified under drought suggested a signal transduction, membrane reorganization, cellular homeostasis maintaining and the activation of carbohydrates metabolisms. Differentially expressed transcripts common to leaf blade and midrib followed similar patterns. However, many DEG were tissue-specific with 958 transcripts only differentially expressed specifically in midrib and 14,578 transcripts in leaf blade. Functions associated with tissue-specific transcripts revealed that transcripts related to glyoxylate metabolism were specifically activated in midrib in association with carbohydrate metabolism, calcium mediated signal transduction, transcription regulator and secondary metabolism. Vesicular transports and endocytosis were particularly repressed in midrib, with only three differentially expressed aquaporins, suggesting that intra- and extra-cellular fluxes were limited in midrib although they were essential in leaf blade responding to drought. Our results supported the idea that solutes and carbohydrates were accumulated and sequestrated in midrib to increase osmotic potential differences between tissues and to promote minimum phloem and xylem fluxes. In contrast, leaf blade developed specific drought responses using high cellular transport activities, membranes and wall structure modifications and hyperosmotic responses, and repressed transcripts related to photosynthesis activity. These modifications prevent cellular dehydration and membranes degradation caused by plasmolysis. Our results showed that phenotypic drought responses were sustained by transcriptional regulations specific of leaf compartments. Microdissection of leaf tissues could bring better indication of molecular regulations and the role of each cell type under drought, especially using a progressive drought kinetic.

Acknowledgements - The authors are indebted to Caroline Nore for providing excellent support in sample treatment for RNA extraction. We are most grateful to Stéphanie Massey for providing excellent support in plant production and common garden maintenance work and Laurent Guillemot for technical assistance. Technical support was provided from GeT-PlaGe platform of GenoToul (INRA-Toulouse, France).

Supplementary data

Supplementary Table 1. Quality of reads obtained by RNAseq on midrib of droughted (D) and well-watered (WW) *Populus nigra*. Reads provided from each sample were sequenced, cleaned, aligned and mapped on *Populus tricocarpa* transcriptome. The rate of reads removed after cleaming steps and the rate of reads mapped were given. Means of these data were avaiblable in the last raw.

Samples	Treatment	Sequenced reads	Reads number after clean	Reads number mapped	Reads removed (%)	Reads mapped (%)
1	D	31 297 766	31 270 462	25 840 535	0,09%	82,64%
12	D	40 784 240	40 742 712	34 458 475	0,10%	84,58%
13	D	24 894 792	24 845 884	20 268 031	0,20%	81,58%
16	D	27 711 118	27 675 592	22 662 363	0,13%	81,89%
24	D	28 037 732	27 992 538	23 227 262	0,16%	82,98%
25	D	28 915 750	28 844 774	23 971 806	0,25%	83,11%
3	D	32 620 340	32 588 388	27 106 164	0,10%	83,18%
33	D	36 544 336	36 463 492	30 222 432	0,22%	82,88%
38	D	31 804 806	31 621 384	25 927 470	0,58%	81,99%
42	D	29 740 484	29 684 856	24 527 282	0,19%	82,63%
6	D	38 649 824	38 610 352	32 182 756	0,10%	83,35%
9	D	33 327 336	33 288 290	28 093 326	0,12%	84,39%
10	WW	36 719 008	36 086 490	30 370 269	1,72%	84,16%
18	WW	24 399 850	24 356 214	20 190 373	0,18%	82,90%
23	WW	32 402 650	32 358 326	27 127 795	0,14%	83,84%
26	WW	36 727 758	36 680 442	30 353 520	0,13%	82,75%
29	WW	34 456 424	34 056 480	28 779 492	1,16%	84,51%
30	WW	29 888 522	29 814 788	24 710 664	0,25%	82,88%
31	WW	28 026 884	27 995 816	23 536 457	0,11%	84,07%
4	WW	35 611 256	35 546 940	30 561 116	0,18%	85,97%
41	WW	34 102 048	34 025 716	28 724 115	0,22%	84,42%
43	WW	30 469 578	30 369 564	25 753 943	0,33%	84,80%
44	WW	32 304 930	32 270 006	27 109 564	0,11%	84,01%
7	WW	36 813 940	36 720 752	30 908 251	0,25%	84,17%
Mean		32 343 807	32 246 260	26 942 227	0,29%	83,49%

Discussion générale et Perspectives

De nombreuses études ont porté sur la caractérisation de la plasticité des traits phénotypiques des espèces dans leur environnement de croissance et dans des milieux à fortes contraintes environnementales à différentes échelles. Les techniques de séquençage à haut débit permettent maintenant d"explorer la régulation de l"ensemble du patrimoine génétique d"une espèce. Il est alors possible d"identifier des portions de chromosomes impliqués dans la régulation des traits phénotypiques (QTL) ou d"étudier les modifications de l"accessibilité des promoteurs des gènes (épigénétique) en lien avec la plasticité adaptative des traits phénotypiques. Cependant, malgré ces progrès, la régulation de la plasticité phénotypique est encore une boite noire et la plasticité des réponses moléculaires largement sous utilisée. Une approche pluridisciplinaire et intégrative a été utilisée dans cette thèse, en se basant sur le degré de plasticité du transcriptome foliaire quantifié pour la première fois, pour explorer la plasticité des réponses phénotypiques et transcriptionnelles de génotypes de peuplier noir répondant à une carence hydrique.

1. La plasticité des réponses phénotypiques et la stratégie écologique des peupliers en réponse au déficit hydrique

Une première étude exploratoire a permis de déterminer la gamme de variation des réponses du peuplier noir au déficit hydrique (Chapitre I). Pour cela, 14 jeunes génotypes de peuplier noir, provenant de différentes rypisilves françaises, ont été soumis à un déficit hydrique progressif atteignant un niveau d"intensité élevé. Le phénotypage de chaque génotype a été réalisé sur la base de traits physiologiques, de croissance et de développement. Ces mesures ont permis d"estimer les degrés de plasticité des traits de chaque génotype et de les confronter à la stratégie de réponse globale (tolérance ou évitement) des génotypes

1.1. La stratégie de réponses à la carence hydrique progressive jusqu"à sévère varie en fonction des génotypes de peuplier noir

Le peuplier noir est une espèce pionnière et mésohygrophile qui possède une vaste répartition en Europe. Cette amplitude de localisation semble suggérer une certaine variabilité de sa capacité de réponse en conditions environnementales fluctuantes (Bazzaz, 1979; Rameau *et al.,* 1989). La plasticité des réponses phénotypiques est une composante essentielle

de la survie des espèces dont la vitesse de migration ne serait pas assez rapide face aux changements climatiques, ce qui les confronterait indubitablement à des conditions environnementales non favorables à leur croissance. Les ajustements de la physiologie et de la croissance mesurés chez les génotypes de peuplier noir suivent les mêmes tendances que les observations de nombreuses autres études et se rapprochent majoritairement d"une stratégie d"évitement du stress hydrique. Cependant, un gradient de différence de réponses phénotypiques se dessine parmi les génotypes étudiés soumis à un stress hydrique progressif (Figure 3 p 67 et Figure 4 p 68). Dans notre étude, un des génotypes se distingue des autres par une faible diminution du potentiel hydrique foliaire et l"absence d"abscission précoce des feuilles qui font de lui un génotype plus tolérant que les autres à une sécheresse intense, mais de courte durée. Ces réponses ont pu être observées chez d"autres espèces de peuplier en conditions de sécheresse (Monclus *et al.,* 2006; Regier *et al.,* 2009; Cocozza *et al.,* 2010; Barchet *et al.,* 2013; Cao *et al.,* 2013; Hamanishi *et al.,* 2015). Les caractéristiques climatiques de l"environnement d"origine d"une espèce laisseraient présager de la stratégie de réponses à la carence hydrique de l"espèce étudiée, ce qui n"est pas forcément le cas du peuplier noir se développant sur des terrains globalement humides (Rameau *et al.,* 1989). Toutefois, bien que l"habitat du peuplier noir soit globalement humide voir inondé, il peut également être soumis à certains moments de l"année à des sécheresses importantes. Il ne faut pas oublier non plus le caractère pionnier de l"espèce sur substrat sec comme décrit dans la littérature (Rameau *et al.,* 1989). Enfin, la diversité génétique de cette espèce constitue un atout accroissant son potentiel de survie grâce à des génotypes plus ou moins sensibles au manque d"eau.

1.2. Le niveau de plasticité du phénotype dépend du génotype et des stratégies de réponses

Le degré de plasticité d"un trait peut être estimé par des normes de réactions ou par des indices. La méthode utilisée dépend de l"objectif de l"étude et du plan expérimental (Valladares *et al.,* 2006). L"utilisation du Relative Distance of Plasticity Index (Valladares *et al.,* 2006) estimant le niveau de plasticité des traits phénotypiques possède de nombreux avantages. En effet, la variabilité de chaque individu (un clone d"un génotype dans notre cas) est intégrée dans le niveau de plasticité et la pondération de cet indice permet de confronter les niveaux de plasticité entre traits et groupe d"individus étudiés (les génotypes dans notre

cas). Notre étude a montré la spécificité génotypique du niveau de plasticité de deux traits mesurés : 1) le potentiel hydrique foliaire de base et 2) l"évolution du nombre total de feuilles traduisant la sénescence foliaire. Ces résultats complètent les connaissances actuelles sur la plasticité des traits dans un environnement où la disponibilité en eau est limitée, en montrant que le potentiel hydrique foliaire de base est le trait mesuré le plus plastique. Un gradient de plasticité phénotypique a été identifié entre génotypes (Figure 5 p 68 et Tableau 3 p 69) comme cela a déjà pu être montré chez différentes espèces de peuplier pour des traits d"anatomie foliaire (Bizet *et al.,* 2014; Guet *et al.,* 2015). Notre étude a démontré que le génotype le plus tolérant au stress hydrique possédait la plus faible plasticité phénotypique, comme cela a aussi été montré chez *Quercus coccifera* et *Pinus Halepensis* (Baquedano *et al.,* 2008). La relation entre stratégie de réponse à un stress et niveau de plasticité phénotypique est difficile à établir, car les réponses des génotypes dépendent entre autre de la pression de sélection du milieu d"origine (Valladares *et al.,* 2007). Certains auteurs font l"hypothèse qu"un génotype adapté à un environnement fortement prédictible associé à une faible pression de sélection, possède une faible plasticité de réponse à un évènement non-prédictible bouleversant l"équilibre de son milieu (Henry et Aarssen, 1997; Valladares *et al.,* 2005; Ghalambor *et al.,* 2007; Willis *et al.,* 2008; Reed *et al.,* 2010). Dans le cas où le déséquilibre est de courte durée et réversible, ce faible niveau de plasticité constituerait un avantage pour le génotype considéré puisque les ressources énergétiques seraient utilisées, non pas pour générer des modifications de métabolisme, mais pour permettre la poursuite de la synthèse de biomasse (Valladares *et al.,* 2000). Cette stratégie peut se révéler risquée sur le long terme, car les plantes qui n"ajustent pas leurs traits physiologiques en réponse à une modification environnementale sont très proches de leurs marges de sécurité hydraulique et carbonée (McDowell *et al.,* 2008). Les dommages encourus par la plante peuvent donc être mortels. A l"inverse, le gaspillage d"énergie dans un ajustement extrême des traits phénotypiques génèrerait une forte plasticité non-essentielle au maintien du génotype dans le milieu et néfaste à la valeur sélective de l"individu (Alpert et Simms, 2002; Steinger *et al.,* 2003). Finalement, la stratégie de réponse à une modification environnementale et le niveau de plasticité phénotypique sont dépendants de l"évolution des espèces, des interactions récurrentes entre génotype et environnement, de l"équilibre des conditions environnementales (Willis *et al.,* 2008; Hargreaves *et al.,* 2014; Early et Sax, 2014; Dalmaris *et al.,* 2015) et de l"interaction entre organismes (Early et Sax, 2014; Bradley *et al.,* 2015; Parmesan et Hanley, 2015). Ces résultats exploratoires ont permis de caractériser la stratégie de réponse et le niveau de plasticité phénotypique de chaque génotype de peuplier noir en carence hydrique.

2. La plasticité transcriptionnelle dépend du génotype et est en lien avec la plasticité phénotypique d‘‘un génotype donné

La diversité de stratégies de réponses et de niveau de plasticité phénotypique identifiée parmi les génotypes de peuplier noir étudiés suggère une diversité des régulations moléculaires mise en place au cours de la sécheresse. Nous avons choisi de nous focaliser sur les régulations transcriptionnelles du limbe foliaire (la feuille sans la nervure principale) en réponse à une carence hydrique, en raison de ses rôles clés dasn la transpiration et la fixation de carbone par la photosynthèse (Chapitre II). Nous avons également quantifié le niveau de plasticité moléculaire en utilisant le RDPI. Pour cela, six génotypes, identifiés au préalable comme présentant des réponses phénotypiques différentes et une plasticité de leurs réponses phénotypiques à la carence hydrique (Chapitre I), ont été soumis à un déficit hydrique progressif atteignant un seuil sévère.

La stratégie de réponse des génotypes au déficit hydrique sévère est cohérente avec les résultats de la première expérimentation. Les génotypes ne se distinguent pas par rapport à leurs réponses phénotypiques précoces à la carence hydrique. En revanche, un gradient de réponses phsiologiques, de croissance et de développement semble les distinguer au maximum du déficit lorsque le niveau de stress est sévère (Figure 1 p 93). Cette spécificité de réponse phénotypique observée chez d‘‘autres génotypes de peuplier noir (Marron *et al.,* 2003; Regier *et al.,* 2009; Larcheveque *et al.,* 2011; Viger *et al.,* 2016) suggére, dans notre expérimentation, une stratégie évitante de cinq génotypes et une stratégie tolérante du dernier génotype tel que définit précédemment. Le génotype le plus tolérant au déficit sévère dans la première expérimentation possède le même comportement dans la deuxième. De même, les cinq autres génotypes restent plutôt évitants au déficit sévère. Nos résultats montrent que l‘‘évolution des réponses physiologiques (des potentiels hydriques, de la conductance stomatique, de l‘‘assimilation carbonée) est commune aux six génotypes testés pendant le stress hydrique.

2.1. Le transcriptome foliaire est fortement modifié en réponse à un déficit hydrique sévère

Les régulations des traits phénotypiques sont soutenues par un important remaniement du transcriptome foliaire. L‘‘étude RNAseq du transcriptome du limbe des peupliers noirs

soumis à un déficit hydrique révèle que près de 41% des transcrits se trouvent différentiellement exprimés. Une telle variation du transcriptome atteste du rôle fondamental de la régulation de l"hydratation foliaire dans le fonctionnement cellulaire, comme cela a été identifié chez d"autres espèces de peupliers (Cossu *et al.,* 2014; Tang *et al.,* 2015). Parmi les modifications du transcriptome foliaire identifiées dans notre étude (Figure 2 p 96), certaines ont pu être mises en évidence chez d"autres espèces répondant au stress hydrique (*e.g.* Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Hamanishi *et al.,* 2010; Cossu *et al.,* 2014; Tang *et al.,* 2015; Pucholt *et al.,* 2015). Il s"agit notamment de transcrits connus pour être sollicités au cours d"une sécheresse et impliqués dans la transduction du signal, le maintien de l"homéostasie cellulaire, la régulation de la transcription, la détoxication de molécules réactives et la stabilité des macromolécules (Golldack *et al.,* 2014; Singh et Laxmi, 2015). En revanche, nos résultats montrent une régulation importante des voies permettant le transport intra- et extra-cellulaire et la modification des propriétés membranaires. Ceci pourrait être dû à une acclimatation de la feuille à l"intensité sévère du déficit hydrique. Nos résultats suggèrent que l"homéostasie et l"intégrité cellulaire sont garanties par un profond remodelage du transcriptome foliaire s"effectuant de façon concomitante avec une réduction de la croissance et du développement des peupliers noirs en carence hydrique sévère.

2.2. Les transports cellulaires sont finement régulés en réponse au déficit hydrique par les aquaporines et la voie de transport vésiculaire

Les aquaporines sont des canaux protéiques transmembranaires connus pour leur intervention dans la régulation des flux d"eau foliaires (Soto *et al.,* 2012; Perez Di Giorgio *et al.,* 2014; Chaumont et Tyerman, 2014; Maurel *et al.,* 2016). L"activité de ces canaux peut être modulée en partie grâce à la régulation du niveau d"expression des gènes codant ces aquaporines ou par la régulation des molécules intermédiaires favorisant leur transport cellulaire (Törnroth-Horsefield *et al.,* 2010; Hachez *et al.,* 2013; Maurel *et al.,* 2015). Le gène codant l"aquaporine PIP1;2 est le plus sur-exprimé dans nos conditions expérimentales (Figure 3 p 99), alors que la plupart des autres isoformes d"aquaporines identifiées (PIP, TIP, NIP et SIP) sont sous-exprimées. Ceci souligne une fois de plus l"intérêt de ces canaux protéiques dans la régulation des flux hydriques et de petites molécules (Chaumont et Tyerman, 2014; Maurel *et al.,* 2015). Malgré la difficulté d"attribuer un rôle à chaque isoforme à partir de la littérature, nous émettons l"hypothèse que la sur-expression des

aquaporines *PIP1;1* et *PIP1;2* permettrait de moduler la perméabilité membranaire (Gaspar, 2003; Fetter, 2004; Sade *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2016) et favoriserait la réparation de l"embolie (Secchi et Zwieniecki, 2010). Les autres isoformes d"aquaporines PIP1 et PIP2 contribueraient au transport du CO_2. La fermeture des stomates induirait une diminution de la concentration en CO_2 ce qui se répercuterait sur l"expression des gènes codant ces aquaporines (Otto *et al.,* 2010; Secchi et Zwieniecki, 2013; Kaldenhoff *et al.,* 2014; Zhao *et al.,* 2016). De plus, la répression de la transcription des gènes codant les isoformes PIP2 et TIP pourrait provoquer la diminution des flux d"eau extra-cellulaires grâce à la rétention d"eau dans la vacuole et dans le cytoplasme afin de limiter la déshydratation cellulaire (Cochard *et al.,* 2006; Hachez *et al.,* 2008; Cocozza *et al.,* 2010).

La régulation de la transcription des aquaporines est souvent associée à leur internalisation cellulaire au sein de vésicules spécifiques permettant un arrêt rapide de leur transport (Luu et Maurel, 2013; Chevalier et Chaumont, 2015). Nous avons donc exploré le niveau de régulation des transcrits participant à la voie de transport de molécules du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. Le transport des molécules du réticulum endoplasmique vers le Golgi est assuré à la suite de leur reconnaissance par les sous-unités Sec (Chevalier *et al.,* 2014; Paul *et al.,* 2014), puis sont sécrétées grâce à des vésicules de transport VAMP dans la membrane cible (Zhang *et al.,* 2011; Hachez *et al.,* 2013). Les syntaxines végétales SYP favorisent la fusion de la vésicule avec la membrane cible afin d"ancrer la molécule dans la bicouche lipidique (Peer 2011; Besserer *et al.,* 2012; Hachez *et al.,* 2014). Des transcrits relatifs à ces trois classes de gènes sont différentiellement exprimés lors du déficit hydrique chez le peuplier noir, en particulier les transcrits codant les SYP121 et des VAMP7 qui pourraient interagir avec les aquaporines (Figure 3 p 100). De plus, ces transcrits pourraient jouer un rôle fondamental dans la stabilisation de la membrane plasmique, dans la communication avec la paroi (Ebine et Ueda, 2015) et dans les régulations de l"homéostasie cellulaire (Uemura *et al.,* 2004; Leshem *et al.,* 2010; Besserer *et al.,* 2012; Hachez *et al.,* 2013) en réponse au stress hydrique sévère.

2.3. La plasticité transcriptionnelle est spécifique du génotype

La plasticité transcriptionnelle à l"échelle du génome entier a été évaluée en utilisant l"indice de plasticité RDPI (Valladares *et al.,* 2006). A notre connaissance, il s"agit de la première analyse de ce genre qui ait été menée. Aucune corrélation n"a été identifiée entre la

plasticité et le niveau d"expression des transcrits ce qui signifie que la régulation de la plasticité transcriptionnelle des gènes ne dépend pas de leur niveau d"expression en condition d"irrigation optimale ou déficiente en eau. En d"autres termes, le transcrit le plus plastique n"est pas obligatoirement le plus exprimé et inversement, quelles que soient les conditions environnementales. Nous avons observé que le degré de plasticité transcriptionnelle moyen était dépendant du génotype. Comme cela a été le cas pour le niveau de plasticité phénotypique (Chapitre I), nous avons observé un gradient de plasticité au sein des six génotypes testés. Le génotype présentant la plus faible plasticité phénotypique et la plus grande tolérance au déficit hydrique court et sévère, possède aussi la plus faible plasticité transcriptionnelle moyenne. Les génotypes les plus évitants possèdent de fortes plasticités phénotypiques et transcriptionnelles pour un même niveau de stress évalué à partir du potentiel hydrique foliaire de base. Cependant, aucune corrélation significative n"a pu être établie entre ces plasticités parmi les génotypes testés. Le niveau de plasticité du génotype le plus tolérant étant faible, l"utilisation des ressources permettant l"ajustement de ses traits physiologiques devrait être la moins coûteuse que pour les autres génotypes (DeWitt *et al.,* 1998; Steinger *et al.,* 2003; Valladares et Niinemets, 2008). Ceci suggère que les faibles plasticités transcriptionnelle et phénotypique pourraient être bénéfiques en réponse à une sécheresse intense et de courte durée chez le génotype de peuplier noir le plus tolérant.

2.4. Des gènes associés à des fonctions cellulaires précises possèdent une plasticité transcriptionnelle spécifique des génotypes

Parmi les expressions de gènes les plus plastiques, 3 800 ne sont pas communs aux six génotypes. Ceci indique que la variabilité génétique des génotypes (une fois de plus supposée) semble influencer la régulation de la plasticité transcriptionnelle. Dans ce cas, identifier les sources de variation génétique, comme les SNP, permettrait de localiser des sites de régulations de la plasticité transcriptionnelle. Le génotype le moins plastique et le plus tolérant à la sécheresse présente une forte plasticité pour les transcrits relatifs à l"ensemble de la machinerie impliquée dans la fixation du carbone et le transport de messagers secondaires (Figure 5 p 102). En revanche, à un niveau de stress équivalent mesuré à l"aide du potentiel hydrique foliaire de base, le génotype le plus plastique et le plus sensible, dit évitant, à la carence hydrique présente une forte plasticité des transcrits intervenant dans des voies de régulations génomique et transcriptionnelle ainsi que dans la sensibilité aux hormones. Parmi

les transcrits les moins plastiques, 5 531 sont spécifiques des génotypes. Le génotype le moins plastique présente la plus faible plasticité pour les transcrits associés au métabolisme du glucose, alors que le génotype le plus plastique présente une faible plasticité transcriptionnelle associée au métabolisme des carbohydrates et au transport vacuolaire. Ces résultats suggèrent que la régulation du métabolisme des carbohydrates est différente entre génotypes ce qui serait crucial dans la spécificité de réponses des génotypes au manque d"eau (Jarzyniak et Jasinski, 2014).

Afin d"étudier la variabilité des réponses moléculaires liée à la régulation des flux d"eau, nous nous sommes intéressés au niveau de plasticité des transcrits responsables des flux hydriques, de petites molécules non chargées et des transports cellulaires. La plasticité de l"expression de six gènes codant des aquaporines (PIP1;2, PIP2;4, TIP1;3, TIP1;7, NIP1;1 et NIP1;2) et celle de deux gènes de la voie de transport vésiculaire (SYP5 et Sec24) sont significativement dépendantes du génotype. Le niveau de plasticité de ces transcrits est fort pour les génotypes ayant une plasticité de réponses physiologiques importante et les plus sensibles, ou évitants, à la sécheresse. En revanche, le génotype le plus tolérant, dont la plasticité des traits physiologiques est la plus faible, présente une plasticité transcriptionnelle faible pour ces transcrits.

Ces résultats montrent que malgré des modulations communes de l"expression différentielle des gènes, le niveau de plasticité transcriptionnelle reste spécifique du génotype. Ceci suggère que le niveau d"expression et la plasticité des transcrits seraient sous contrôle de mécanismes de régulation différents. Enfin, le degré de plasticité transcriptionnelle étant spécifique du génotype, le coût de cette plasticité semble hétérogène parmi les génotypes.

2.5. La plasticité des traits phénotypiques peut être associée à la plasticité de l"expression de groupes de gènes

Les plasticités phénotypique et transcriptionnelle semblent corrélées comme cela a pu être identifié par les études épigénétiques et QTL (Fabbrini *et al.,* 2012; Han et Wagner, 2014; Alsdurf *et al.,* 2016; Thomas *et al.,* 2016). Nous avons cherché à identifier les processus biologiques dont la plasticité est corrélée avec celle des traits phénotypiques.

Les corrélations entre les plasticités de certains traits phénotypiques et transcriptionnelles sont identiques parmi les génotypes. Ceci pourrait être expliqué par un mécanisme de perception du signal environnemental relativement conservés au sein de l"espèce, alors que la régulation du degré de plasticité resterait spécifique du génotype. Les plasticités de trois traits phénotypiques relatifs à la croissance longitudinale, la physiologie foliaire (la conductance stomatique) et l"anatomie foliaire (la couverture de la nervure principale) sont fortement corrélées à des voies métaboliques rassemblant au total 681 transcrits (Figure 6 p 104). La plasticité de la conductance stomatique est corrélée à celle des transcrits impliqués dans les stimuli endogènes, la protéolyse et le développement floral et négativement corrélée à la plasticité des transcrits PIP1;2. La plasticité des transcrits liés à la protéolyse, à la croissance et à l"homéostasie cellulaire est corrélée à celle de la croissance longitudinale. La plasticité de la couverture de la nervure principale est essentiellement corrélée à celle des transcrits de l"homéostasie cellulaire, puis de la modification protéique, du transport et de la signalisation. Les transcrits TIP2 ;1, connus pour intervenir dans la régulation des conductances hydrauliques foliaire et stomatique (Pou *et al.,* 2013), sont négativement corrélés avec la couverture de la nervure principale. Il semble que la régulation de l"ajustement osmotique et l"anatomie foliaire évoluent conjointement, en conditions hydriques limitantes (Cutler *et al.,* 1980; Bosabalidis et Kofidis, 2002; Harb *et al.,* 2010;Tosens *et al.,* 2012; Galmés *et al.,* 2013).

Finalement, l"analyse du transcriptome complet de feuilles développées au cours de la carence hydrique indique un bouleversement des régulations menant à une restructuration profonde du fonctionnement cellulaire dans le but de maintenir l"hydratation et l"intégrité des tissus. Les mécanismes de régulation de la plasticité semble également relativement conservés chez le peuplier noir, avec une conservation des corrélations entre plasticité des traits transcriptionnels et phénotypiques entre génotypes. En revanche, l"exploration de la plasticité transcriptionnelle indique que le degré de plasticité de l"expression des gènes est spécifique des génotypes. Ces résultats suggèrent qu"il existerait deux grands groupes de gènes : les gènes activant la réponse physiologique après perception du signal environnemental et ceux déterminant le degré de plasticité (Thomas *et al.,* 2016).

3. Les réponses transcriptionnelles sont différentes entre nervure principale et limbe

L"analyse des régulations transcriptionnelles des feuilles et des racines de différentes espèces végétales répondant à un déficit hydrique révèlent une expression spécifique de l"organe (Cohen *et al.,* 2010; Ksouri *et al.,* 2016; Rattanakon *et al.,* 2016; Xue *et al.,* 2016). Les organes comme les tissus possèdent une fonctionnalité qui leur est propre. Dans le cadre de l"étude des réponses physiologiques, nous avons étudié pour la première fois le transcriptome de la nervure principale de la feuille chez *Populus nigra* répondant à un déficit hydrique sévère (Chapitre III). Afin d"identifier la spécificité de régulation, le transcriptome de la nervure a été comparé au transcriptome du limbe (Chapitre III).

3.1. Le transcriptome de la nervure principale est modulé en réponse au déficit hydrique

La nervure principale est composée de plusieurs tissus (xylème, phloème et gaine périvasculaire). Nous avons observé que les nervures principales répondent au déficit hydrique par une régulation de 20% de leur transcriptome. Cette régulation est deux fois moins importante que celle observée dans le limbe, celui-ci contenant également plus de tissus caractérisés par des fonctionnalités différentes (comme les parenchymes, l"épiderme, les nervures d"ordre supérieur à 2, les stomates). L"étude des GO des 6 552 transcrits sur-exprimés spécifiquement dans les nervures a montré leur implication dans de nombreux processus biologiques (Figure 1 p 128). Ces processus biologiques sont communément identifiés dans les réponses au stress hydrique, comme la transduction de signal par l"acide nitrique (Gupta *et al.,* 2011; Vanlerberghe, 2013), la restructuration des membranes au travers de la production d"acides gras par l"acétyl-CoA (Ke *et al.,* 2000; Lin et Oliver, 2008; Xiao et Chye, 2011), l"homéostasie cellulaire par les ions ferriques (Morrissey et Guerinot, 2009; Jain et Connolly, 2013; Vigani *et al.,* 2013) et les prolines (Choudhary *et al.,* 2005; Cocozza *et al.,* 2010; Mewis *et al.,* 2012; Liu *et al.,* 2015; Hamanishi *et al.,* 2015) et le métabolisme des carbohydrates (Hare *et al.,* 1998; Rosa *et al.,* 2009; Krasensky et Jonak, 2012). Nos résultats confirment qu"un faible potentiel hydrique s"accompagne d"une fermeture stomatique et d"un flux de sève brute dans le xylème fortement réduit. Sachant que les flux de fluides du xylème et du phloème sont étroitement liés, les forces source et puits des organes devraient diminuer dans les conditions de sécheresse sévère imposées (Ruehr *et al.,* 2009). La dilution de la sève

élaborée serait alors réduite, augmentant ainsi sa viscosité et diminuant la vitesse de transport des sucres (Sevanto 2014). On peut émettre l"hypothèse que les sucres produits par le métabolisme des carbohydrates, en l"absence de photosynthèse, s"accumuleraient au niveau des cellules du phloème afin d"augmenter leur potentiel osmotique et de contraindre un relargage d"eau du xylème vers le phloème (McDowell 2011; Lemoine *et al.,* 2013). Ceci permettrait le maintien d"un flux de sève élaborée, retarderait l"embolie des vaisseaux de xylème, et permettrait le maintien de la croissance des jeunes feuilles (McDowell et Sevanto, 2010). Cette hypothèse est confortée par l"observation d"une très forte répression des transcrits liés au transport des carbohydrates qui suggèrent une séquestration des sucres dans les cellules.

De plus, les transcrits codant des protéines impliquées dans le fonctionnement des photosystèmes sont fortement sous-exprimés. Ces processus biologiques pourraient être liés puisqu"il a été montré chez des tomates sur-exprimant une hexokinase (enzyme impliquée dans la synthèse des hexoses), que l"accumulation des carbohydrates agirait comme un signal pour la réduction de la fixation de carbone par photosynthèse et la sénescence précoce (Dai *et al.,* 1999). Un signal fort de diminution de croissance et de développement par différenciation cellulaire et mitose a aussi été identifié dans nos résultats. Il s"ajoute à la diminution de la croissance et du développement des organes caulinaires et des modifications anatomiques observées. Des modifications développementales simlaires ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales dont le peuplier en réponse à un déficit hydrique (*e.g.* Lecoeur *et al.,* 1995; Berta *et al.,* 2010; Anjum *et al.,* 2011; Avramova *et al.,* 2015).

Enfin, une réponse métabolique surprenante a été observée : la répression des transcrits liés à la voie de biosynthèse de la Streptomycine. Les Streptomycètes, responsables de la synthèse de cet antibiotique (Distler *et al.,* 1992), sont ubiquistes de nombreux types de sols et certains d"entre eux sont symbiotiques des végétaux, améliorant leur croissance et leur résistance aux stress biotiques grâce à la production d"auxine et de composés antimicrobiens (Seipke *et al.,* 2012). Il serait pertinent d"identifier la présence et l"activité de ces micro-organismes dans les feuilles de peuplier qui pourraient constituer des acteurs importants des régulations hydriques et énergétiques.

3.2. Certains transcrits sont spécifiquement régulés dans la nervure principale

Les gènes différentiellement exprimés dans la nervure principale (11 639 transcrits, soit 19% du transcriptome foliaire) le sont aussi dans le limbe (Chapitre II et III). Ainsi, les

transcrits sur-exprimés dans le limbe sont aussi sur-exprimés dans la nervure principale, et inversement (Figure 2 p 132). Cependant, 958 transcrits sont spécifiquement régulés dans la nervure principale alors qu"ils ne sont pas différentiellement exprimés dans le limbe (Figure 5 p 134).

Parmi les 600 transcrits sur-exprimés, une grande partie code pour les protéines impliquées dans le métabolisme du glyoxylate. Cette molécule connue pour oxyder les lipides membranaires, influence la transcription et modifie les protéines en cas de photorespiration lors d"un stress hydrique (Weber *et al.,* 2004; Kotchoni *et al.,* 2006; Aprile *et al.,* 2013; Chen *et al.,* 2013). De plus, certains transcrits sur-exprimés appartiennent au métabolisme des carbohydrates suggérant que des transcrits sont spécifiquement activés dans la nervure principale pour la régulation du transport des sucres. La présence de ces modifications transcriptionnelles renforce l"hypothèse de l"importance de l"accumulation des sucres au niveau des nervures lors de la réponse à la sécheresse. Ces voies sont associées à des transcrits impliqués dans les voies de transduction de signal par le calcium (Zhu, 2002; Conde *et al.,* 2011; Nick, 2013), de régulation de l"expression par des facteurs de transcription et de synthèse de métabolites secondaires dont certains possèdent une activité antioxydante (Bray 2004; Minic 2008; McKiernan *et al.,* 2015; Niinemets 2015).

Parmi les 358 transcrits spécifiquement réprimés dans la nervure principale, plusieurs pourraient expliquer les résultats observés de diminution de croissance et de développement foliaire. La sous-expression de gènes relatifs à la mort cellulaire est intéressante, elle pourrait signifier que les tissus foliaires étudiés sont toujours bien vivants. Enfin, le transport des molécules et l"endocytose semblent diminuer dans les nervures avec une sous expression des transcrits rattachés à des transporteurs et à l"endosome, organite connu pour son rôle dans le recyclage des vésicules de transport de l"endocytose (Otegui et Spitzer, 2008). Ces résultats montrent que le transport vésiculaire semble fortement réprimé dans les nervures en réponse au stress hydrique.

L"absence de détection des transcrits relatifs à la voie de transport vésiculaire par les intermédiaires SYP, VAMP et protéines à Sec-domaine renforce cette hypothèse. La résolution de la technique RNAseq est puissante, mais les transcrits trop faiblement exprimés ne peuvent pas être détectés (Wang *et al.,* 2009). L"expression des transcrits de la voie de transport vésiculaire est donc faible voire absente dans la nervure principale quelles que soient les conditions hydriques. Ceci suggère que les transports intra- et extra-cellulaires sont limités dans cette zone de la feuille alors qu"ils constituent un pilier du fonctionnement cellulaire dans le limbe. Cependant, certains gènes codant des aquaporines sont différentiellement

exprimés dans la nervure principale comme dans le limbe, comme le montre la sur-expression des transcrits *PIP1;2* et la sous-expression des transcrits *SIP1;1* et *SIP2;1*. Les aquaporines ne sont donc pas régulées uniquement dans la nervure. En revanche, l"accumulation des transcrits *PIP1;2* dans la nervure principale renforce les possibilités de régulations hydriques émises dans le Chapitre II, selon lesquelles la réparation de l"embolie pourrait être favorisée en forçant le flux d"eau vers les cellules embolisées (Martre, 2002; Secchi et Zwieniecki, 2010; Secchi et Zwieniecki, 2014) ainsi que les régulations hydriques et osmotiques (Fetter, 2004; Prado *et al.,* 2013; Sade *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2016).

3.3. La régulation de certains transcrits est spécifique du limbe

Le transcriptome du limbe (feuille entière sans la nervure principale) est profondément modulé comparé à celui de la nervure principale puisque 14 578 transcrits sont différentiellement exprimés uniquement dans le limbe, parmi lesquels 5 536 sont accumulés et 9 042 sont réprimés. Les transcrits sur-exprimés spécifiques du limbe font référence à la modification des propriétés biochimiques et physiques des membranes (Lynch et Steponkus, 1987; Warnecke et Heinz, 2003), au transport de l"eau (Maurel *et al.,* 1993; Chaumont *et al.,* 2000) et aux réponses hyperosmotiques (Figure 6 p 135). Cette dernière réponse est la conséquence du stress hydrique sévère qui génère une modification de la composition des membranes, une accumulation de solutés et de carbohydrates. Ceci augmenterait le potentiel osmotique cellulaire et séquestrerait l"eau dans les cellules (Zhu, 2002; Boudsocq et Laurière, 2005; Cohen *et al.,* 2010; Krasensky et Jonak, 2012; Hamanishi *et al.,* 2015). De telles modifications transcriptionnelles sont effectivement observées dans le limbe (Chapitre II) et sont associées à des transcrits différentiellement exprimés et spécifiques du limbe codant des protéines impliquées dans le maintien de l"homéostasie cellulaire (Choudhary *et al.,* 2005; Cocozza *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2015; Hamanishi *et al.,* 2015) et la détoxication (Caruso *et al.,* 2002; Bogeat-Triboulot *et al.,* 2007; Szabados et Savouré, 2010). Au contraire, certains transcrits spécifiques sous-exprimés sont impliqués dans la signalisation des cytokines, pouvant induire une répression de la croissance et une augmentation de la sensibilité à l"ABA (Hwang *et al.,* 2012; Griffiths *et al.,* 2014). De plus, la composition et la structure des parois notamment la cellulose (Suzuki *et al.,* 2006; Verhertbruggen *et al.,* 2011) et la pectine (Micheli 2001; Houston *et al.,* 2016) semblent modifiées.

4. Perspectives

Dans notre étude, les réponses phénotypiques et transcriptionnelles ainsi que les niveaux de plasticité caractérisent un seul état physiologique de la plante en déficit hydrique sévère. Or, il a été mis en évidence que le transcriptome foliaire évolue rapidement au cours d"un déficit hydrique progressif (Wilkins *et al.,* 2009; Hamanishi *et al.,* 2015). Le déficit progressif génère une modification régulière des niveaux de transcription des gènes qui n"est pas immédiate en raison du temps de latence entre la perception du signal, sa transduction, les modifications moléculaires et les ajustements de la plasticité. Notre étude met donc en évidence des niveaux d"expression et de plasticité transcriptionnelle qui ne reflètent pas uniquement les régulations existant du moment de prélèvement, mais intègre aussi les informations passées. Il serait donc pertinent d"étudier la réponse transcriptionnelle de la feuille de peuplier noir au cours du déficit hydrique, en cinétique. Ceci permettra de dégager un réseau de gènes mis en place dans le cadre de cette réponse et d"avoir une vision globale des régulations moléculaires. Enfin, il apparait que le microbiote du peuplier pourrait intervenir dans ces réponses à l"environnement. Une étude exploratoire de la présence de microorganismes symbiotiques du peuplier serait donc à envisager à l"échelle de la feuille.

Bibliographie

Aasamaa K, Niinemets Ü, Sõber A. 2005. *Leaf hydraulic conductance in relation to anatomical and functional traits during Populus tremula leaf ontogeny. Tree Physiology* ***25****: 1409–1418.*

Aasamaa K, Sõber A, Hartung W, Niinemets Ü. 2004. *Drought acclimation of two deciduous tree species of different layers in a temperate forest canopy. Trees* ***18****: 93–101.*

Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. 2014. *Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* ***1840****: 1468–1481.*

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. The Plant Cell* ***15****: 63–78.*

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. 1997. *Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. The Plant Cell* ***9****: 1859–1868.*

Abiri R, Shaharuddin NA, Maziah M, et al. 2017. *Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. Environmental and Experimental Botany* ***134****: 33–44.*

Abreu EFM, Aragao FJL. 2006. *Isolation and Characterization of a myo-inositol-1-phosphate Synthase Gene from Yellow Passion Fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa) Expressed During Seed Development and Environmental Stress. Annals of Botany* ***99****: 285–292.*

Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ. 2006. *Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of G and G and do not dissociate upon activation. Journal of Cell Science* ***119****: 5087–5097.*

Afzal Z, Howton T, Sun Y, Mukhtar M. 2016. *The Roles of Aquaporins in Plant Stress Responses. Journal of Developmental Biology* ***4****: 9.*

Aitken A, Cohen P, Santikarn S, et al. 1982. *Identification of the NH2-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. FEBS letters* ***150****: 314–318.*

Akoh CC, Lee G-C, Liaw Y-C, Huang T-H, Shaw J-F. 2004. *GDSL family of serine esterases/lipases. Progress in Lipid Research* ***43****: 534–552.*

Alexandersson E, Danielson JÅH, Råde J, et al. 2010. *Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of Arabidopsis in response to drought stress. The Plant Journal* ***61****: 650–660.*

Alía R, Moro J, Denis JB. 1997. *Performance of Pinus pinaster provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. Canadian Journal of Forest Research* ***27****: 1548–1559.*

Allagulova CR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA. 2003. *The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry. Biokhimiia* ***68****: 945–951.*

Allan WL, Clark SM, Hoover GJ, Shelp BJ*. *2009*.** *Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. Biochemical Journal* ***423*: 15–22.*

Almeida-Rodriguez AM, Cooke JEK, Yeh F, Zwiazek JJ*. *2010*.** *Functional characterization of drought-responsive aquaporins in Populus balsamifera and Populus simonii x balsamifera clones with different drought resistance strategies. Physiologia Plantarum* ***140*: 321–333.*

Alpert P, Simms E*. *2002*.** *The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? Evolutionary Ecology* ***16*: 285–297.*

Alsdurf J, Anderson C, Siemens DH*. *2016*.** *Epigenetics of drought-induced trans-generational plasticity: consequences for range limit development. AoB Plants* ***8*: plv146.*

Ampah-Korsah H, Anderberg HI, Engfors A, et al. 2016*.** *The Aquaporin Splice Variant NbXIP1;1α Is Permeable to Boric Acid and Is Phosphorylated in the N-terminal Domain. Frontiers in Plant Science* ***7*: 1–17.*

Anderegg WRL, Plavcová L, Anderegg LDL, Hacke UG, Berry JA, Field CB*. *2013*.** *Drought's legacy: multiyear hydraulic deterioration underlies widespread aspen forest die-off and portends increased future risk. Global Change Biology* ***19*: 1188–1196.*

Anderson CM, Kohorn BD*. *2001*.** *Inactivation of Arabidopsis SIP1 leads to reduced levels of sugars and drought tolerance. Journal of Plant Physiology* ***158*: 1215–1219.*

Angert AL, LaDeau SL, Ostfeld RS*. *2013*.** *Climate change and species interactions: ways forward: Climate change and species interactions. Annals of the New York Academy of Sciences* ***1297*: 1–7.*

Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W*. *2011*.** *Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African Journal of Agricultural Research* ***6*: 2026–2032.*

Anthony RG, Henriques R, Helfer A, et al. 2004*.** *A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis. The EMBO journal* ***23*: 572–581.*

Aprile A, Havlickova L, Panna R, et al. 2013*.** *Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. BMC Genomics* ***14*: 821.*

Araújo WL, Fernie AR, Nunes-Nesi A*. *2011*.** *Control of stomatal aperture: A renaissance of the old guard. Plant Signaling & Behavior* ***6*: 1305–1311.*

Armstrong GA, Weisshaar B, Hahlbrock K*. *1992*.** *Homodimeric and Heterodimeric Leucine Zipper Proteins and Nuclear Factors from Parsley Recognize Diverse Promoter Elements with ACGT Cores. The Plant Cell* ***4*: 525.*

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. 2000*.** *Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics* ***25*: 25–29.*

Ashton PMS, Berlyn GP*. *1994*.** *A Comparison of Leaf Physiology and Anatomy of Quercus (Section Erythrobalanus-Fagaceae) Species in Different Light Environments. American Journal of Botany* ***81*: 589.*

Avramova V, AbdElgawad H, Zhang Z, et al. 2015*.** *Drought Induces Distinct Growth Response, Protection, and Recovery Mechanisms in the Maize Leaf Growth Zone. Plant Physiology* ***169*: 1382–1396.*

Azevedo RA, Lea PJ*. *2001*.** *Lysine metabolism in higher plants. Amino Acids* ***20*: 261–279.*

Bae E-K, Lee H, Lee J-S, Noh E-W*. *2009*.** *Differential expression of a poplar SK2-type dehydrin gene in response to various stresses. BMB reports* ***42*: 439–443.*

Baldo A, Norelli JL, Farrell RE, Bassett CL, Aldwinckle HS, Malnoy M*. *2010*.** *Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (Malus × domestica) with Erwinia amylovora. BMC Plant Biology* ***10*: 1.*

Baldoni E, Genga A, Cominelli E*. *2015*.** *Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences* ***16*: 15811–15851.*

Ball J, Carle J, Del Lungo A*. *2005*.** *Contribution des peupliers et des saules à la valorisation durable des forêts et au développement rural. Unasylva* ***56*: 3–9.*

Baquedano FJ, Valladares F, Castillo FJ*. *2008*.** *Phenotypic plasticity blurs ecotypic divergence in the response of Quercus coccifera and Pinus halepensis to water stress. European Journal of Forest Research* ***127*: 495–506.*

Barchet GLH, Dauwe R, Guy RD, et al. 2013*.** *Investigating the drought-stress response of hybrid poplar genotypes by metabolite profiling. Tree Physiology* ***34*: 1203–1219.*

Barigah TS, Charrier O, Douris M, et al. 2013*.** *Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. Annals of Botany* ***112*: 1431–1437.*

Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, et al. 2011*.** *Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature* ***471*: 51–57.*

Barrs HD*. *1971*.** *Cyclic Variations in Stomatal Aperture, Transpiration, and Leaf Water Potential Under Constant Environmental Conditions. Annual Review of Plant Physiology* ***22*: 223–236.*

Battaglia M, Cherry ML, Beadle CL, Sands PJ, Hingston A*. *1998*.** *Prediction of leaf area index in eucalypt plantations: effects of water stress and temperature. Tree Physiology* ***18*: 521–528.*

Battaglia M, Solórzano RM, Hernández M, et al. 2007*.** *Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. Planta* ***225*: 1121–1133.*

Battey NH*. *1999*.** *Exocytosis and Endocytosis. The Plant Cell Online* ***11*: 643–660.*

***Baucher M, Pérez-Morga D, El Jaziri M*. *2012*.** *Insight into plant annexin function: From shoot to root signaling. Plant Signaling & Behavior **7**: 524–528.*

***Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, Bailey-Serres J*. *2002*.** *RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. Science (New York, N.Y.) **296**: 2026–2028.*

***Bazzaz FA*. *1979*.** *The Physiological Ecology of Plant Succession. Annual Review of Ecology and Systematics **10**: 351–371.*

***Beavis W*. *1998*.** *QTL analyses: Power, precision, and accuracy In: Molecular Dissection of Complex Traits. Boca Raton: Paterson, A.H., 145–162.*

***Beerling D, Franks P*. *2010*.** *The hidden cost of transpiration.Nature 464: 495-496.*

***Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ*. *2009*.** *Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. New Phytologist **181**: 413–423.*

***Bellati J, Alleva K, Soto G, Vitali V, Jozefkowicz C, Amodeo G*. *2010*.** *Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. Plant Molecular Biology **74**: 105–118.*

***Benetka V, Mottl J, Vackova K, Pospiskova M, Dubsky M*. *1999*.** *Estimation of the introgression level in Populus nigra L. populations by means of isozyme gene markers. Silvae Genetica **48**: 218–223.*

***Beniston M, Stephenson DB, Christensen OB, et al. 2007*.** *Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections. Climatic Change **81**: 71–95.*

***Benjamini Y, Hochberg Y*. *1995*.** *Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society **57**: 289–300.*

***Benjamini Y, Yekutieli D*. *2001*.** *The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. The Annals of Statistics **29**: 1165–1188.*

***Berta M, Giovannelli A, Sebastiani F, Camussi A, Racchi ML*. *2010*.** *Transcriptome changes in the cambial region of poplar (Populus alba L.) in response to water deficit. Plant Biology **12**: 341–354.*

***Bertrand R, Lenoir J, Piedallu C, et al. 2011*.** *Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland forests. Nature **479**: 517–520.*

***Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, et al. 2012*.** *Selective Regulation of Maize Plasma Membrane Aquaporin Trafficking and Activity by the SNARE SYP121. The Plant Cell **24**: 3463–3481.*

***Bienert GP, Chaumont F*. *2014*.** *Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1840**: 1596–1604.*

Bizet F, Bogeat-Triboulot M-B, Montpied P, et al. 2014. *Phenotypic plasticity toward water regime: response of leaf growth and underlying candidate genes in Populus. Physiologia Plantarum* ***154****: 39–53.*

Blackman CJ, Brodribb TJ, Jordan GJ. ***2010***. *Leaf hydraulic vulnerability is related to conduit dimensions and drought resistance across a diverse range of woody angiosperms. New Phytologist* ***188****: 1113–1123.*

Blanch J-S, Peñuelas J, Sardans J, Llusià J. ***2009***. *Drought, warming and soil fertilization effects on leaf volatile terpene concentrations in Pinus halepensis and Quercus ilex. Acta Physiologiae Plantarum* ***31****: 207–218.*

Bochkov DV, Sysolyatin SV, Kalashnikov AI, Surmacheva IA. ***2012***. *Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. Journal of Chemical Biology* ***5****: 5–17.*

Bogeat-Triboulot M-B, Brosche´ M, Renaut J, et al. 2007. *Gradual Soil Water Depletion Results in Reversible Changes of Gene Expression, Protein Profiles, Ecophysiology, and Growth Performance in Populus euphratica, a Poplar Growing in Arid Regions. Plant Physiology* ***143****: 876–892.*

Bonhomme L, Barbaroux C, Monclus R, et al. 2008. *Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. Annals of Forest Science* ***65****: 503–503.*

Bonhomme L, Monclus R, Vincent D, et al. 2009. *Genetic variation and drought response in two Populus×euramericana genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. Phytochemistry* ***70****: 988–1002.*

Bonner JT. ***2006***. *Why size matters: from bacteria to blue whales. Princeton: Princeton University Press.*

Bordo D. ***2002***. *The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. EMBO Reports* ***3****: 741–746.*

Bosabalidis AM, Kofidis G. ***2002***. *Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. Plant Science* ***163****: 375–379.*

Boudsocq M, Laurière C. ***2005***. *Osmotic Signaling in Plants. Multiple Pathways Mediated by Emerging Kinase Families. Plant Physiology* ***138****: 1185–1194.*

Boursiac Y. ***2005***. *Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. Plant Physiology* ***139****: 790–805.*

Bowler C, Fluhr R. ***2000***. *The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Trends in Plant Science* ***5****: 241–246.*

Boyce CK, Brodribb TJ, Feild TS, Zwieniecki MA. ***2009***. *Angiosperm leaf vein evolution was physiologically and environmentally transformative. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* ***276****: 1771–1776.*

***Bradley BA, Early R, Sorte CJB*. *2015*. *Space to invade? Comparative range infilling and potential range of invasive and native plants: Comparative distributions of natives versus invasives. Global Ecology and Biogeography **24**: 348–359.*

***Bradshaw AD*. *1965*. *Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. Advances in Genetics **13**: 115–155.*

***Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R*. *2000*. *Emerging model systems in plant biology: poplar (Populus) as a model forest tree. Journal of Plant Growth Regulation **19**: 306–313.*

***Bray EA*. *1997*. *Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science **2**: 48–54.*

***Bray EA*. *2004*. *Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany **55**: 2331–2341.*

***Bréda N, Granier A, Aussenac*. *2004*. *La sécheresse de 2003 dans le contexte climatique des 54 dernières années : analyse écophysiologique et influence sur les arbres forestiers. Risques Naturels ou Humains **2**: 109–131.*

***Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E*. *2006*. *Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. Annals of Forest Science **63**: 625–644.*

***Briffa KR, Shishov VV, Melvin TM, et al. 2008*. *Trends in recent temperature and radial tree growth spanning 2000 years across northwest Eurasia. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **363**: 2269–2282.*

***Brignolas F, Thierry C, Guerrier G, Boudouresque E*. *2000*. *Compared water deficit response of two Populus x euramericana clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. Annals of Forest Science **57**: 261–266.*

***Brilli F, Barta C, Fortunati A, Lerdau M, Loreto F, Centritto M*. *2007*. *Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (Populus alba) saplings. New Phytologist **175**: 244–254.*

***Brini F, Saibi W, Amara I, Gargouri A, Masmoudi K, Hanin M*. *2010*. *Wheat Dehydrin DHN-5 Exerts a Heat-Protective Effect on β-Glucosidase and Glucose Oxidase Activities. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **74**: 1050–1054.*

***Brodribb TJ, Cochard H*. *2009*. *Hydraulic Failure Defines the Recovery and Point of Death in Water-Stressed Conifers. Plant Physiology **149**: 575–584.*

***Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ*. *2007*. *Leaf Maximum Photosynthetic Rate and Venation Are Linked by Hydraulics. Plant Physiology **144**: 1890–1898.*

***Brodribb TJ, Feild TS, Sack L*. *2010*. *Viewing leaf structure and evolution from a hydraulic perspective. Functional Plant Biology **37**: 488.*

***Brodribb TJ, Holbrook NM*. *2003*. *Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits. Plant Physiology **132**: 2166–2173.*

Brodribb TJ, Holbrook NM*. *2004*.** *Diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a tropical tree species. Plant, Cell & Environment* ***27*: 820–827.*

Brodribb TJ, Holbrook NM*. *2005*.** *Water Stress Deforms Tracheids Peripheral to the Leaf Vein of a Tropical Conifer. Plant Physiology* ***137*: 1139–1146.*

Brodribb TJ, Holbrook NM*. *2006*.** *Declining hydraulic efficiency as transpiring leaves desiccate: two types of response*. Plant, Cell & Environment* ***29*: 2205–2215.*

Brodribb TJ, Holbrook NM, Gutierrez MV*. *2002*.** *Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. Plant, Cell and Environment* ***25*: 1435–1444.*

Brodribb TJ, Jordan GJ*. *2011*.** *Water supply and demand remain balanced during leaf acclimation of Nothofagus cunninghamii trees. New Phytologist* ***192*: 437–448.*

***Brodribb TJ, Skelton RP, McAdam SAM, Bienaimé D, Lucani CJ, Marmottant P*. *2016*.** *Visual quantification of embolism reveals leaf vulnerability to hydraulic failure. New Phytologist: 209: 1403-1409.*

Brown SA, Neish AC*. *1955*.** *Shikimic acid as a precursor in lignin biosynthesis. Nature* ***175*: 688–689.*

Brüggemann N, Schnitzler J-P*. *2002*.** *Comparison of Isoprene Emission, Intercellular Isoprene Concentration and Photosynthetic Performance in Water-Limited Oak (Quercus pubescens Willd. and Quercus robur L.) Saplings. Plant Biology* ***4*: 456–463.*

Buckley TN*. *2015*.** *The contributions of apoplastic, symplastic and gas phase pathways for water transport outside the bundle sheath in leaves: Leaf water pathways. Plant, Cell & Environment* ***38*: 7–22.*

Buckley TN, John GP, Scoffoni C, Sack L*. *2015*.** *How Does Leaf Anatomy Influence Water Transport outside the Xylem? Plant Physiology* ***168*: 1616–1635.*

Buckley TN, Sack L, Gilbert ME*. *2011*.** *The Role of Bundle Sheath Extensions and Life Form in Stomatal Responses to Leaf Water Status. Plant Physiology* ***156*: 962–973.*

***Burkett VR, Suarez AG, Bindi M, et al. 2014*.** *Point of departure. In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L.White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.*

Busby MA, Stewart C, Miller CA, Grzeda KR, Marth GT*. *2013*.** *Scotty: a web tool for designing RNA-Seq experiments to measure differential gene expression. Bioinformatics* ***29*: 656–657.*

Cagelli L, Lefèvre F*. *1995*.** *The conservation of Populus nigra L. and gene flow with cultivated poplars in Europe. Forest Genetics* ***3*: 135–144.*

Cahill AE, Aiello-Lammens ME, Fisher-Reid MC, et al. 2012. *How does climate change cause extinction? Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* ***280****: 20121890–20121890.*

Caldeira CF, Bosio M, Parent B, Jeanguenin L, Chaumont F, Tardieu F. ***2014***. *A Hydraulic Model Is Compatible with Rapid Changes in Leaf Elongation under Fluctuating Evaporative Demand and Soil Water Status. Plant Physiology* ***164****: 1718–1730.*

Cao X, Jia J, Zhang C, et al. 2013. *Anatomical, physiological and transcriptional responses of two contrasting poplar genotypes to drought and re-watering. Physiologia Plantarum* ***151****: 480–494.*

Carins Murphy MR, Jordan GJ, Brodribb TJ. ***2012***. *Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. Plant, Cell & Environment* ***35****: 1407–1418.*

Carins Murphy MR, Jordan GJ, Brodribb TJ. ***2014***. *Acclimation to humidity modifies the link between leaf size and the density of veins and stomata: VPD alters the link between leaf size and anatomy. Plant, Cell & Environment* ***37****: 124–131.*

Caruso A, Morabito D, Delmotte F, Kahlem G, Carpin S. ***2002***. *Dehydrin induction during drought and osmotic stress in Populus. Plant Physiology and Biochemistry* ***40****: 1033–1042.*

de Carvalho MHC. ***2008***. *Drought stress and reactive oxygen species.* ***3****: 156–165.*

Cassab GI, Eapen D, Campos ME. ***2013***. *Root hydrotropism: An update. American Journal of Botany* ***100****: 14–24.*

Ceulemans R, Stettler RF, Hinckley TM, Isebrands JG, Heilman PE. ***1990***. *Crown architecture of Populus clones as determined by branch orientation and branch characteristics. Tree Physiology* ***7****: 157–167.*

Chamaillard S, Fichot R, Vincent-Barbaroux C, et al. 2011. *Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three Populus nigra L. populations. Tree Physiology* ***31****: 1076–1087.*

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.*

Charru M, Seynave I, Morneau F, Bontemps J-D. ***2010***. *Recent changes in forest productivity: An analysis of national forest inventory data for common beech (Fagus sylvatica L.) in north-eastern France. Forest Ecology and Management* ***260****: 864–874.*

Chaumont Francois, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. ***2000***. *Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity. Plant Physiology* ***122****: 1025–1034.*

Chaumont François, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. ***2000***. *Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity. Plant Physiology* ***122****: 1025–1034.*

Chaumont F, Tyerman SD. ***2014a***. *Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. PLANT PHYSIOLOGY* ***164****: 1600–1618.*

Chaumont F, Tyerman SD*. *2014b*.** *Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. Plant Physiology* ***164*: 1600–1618.*

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C*. *2008*.** *Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany* ***103*: 551–560.*

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS*. *2003*.** *Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. Functional Plant Biology* ***30*: 239.*

Chen Y-E, Liu W-J, Su Y-Q, et al. 2016*.** *Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum* ***158*: 225–235.*

Chen J, Song Y, Zhang H, Zhang D*. *2013*.** *Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Response to Drought Stress in Populus simonii. Plant Molecular Biology Reporter* ***31*: 946–962.*

***Chevalier AS, Bienert GP, Chaumont F*. *2014*.** *A new LxxxA motif in the transmembrane helix 3 of maize PIP2 aquaporins is required for their trafficking to the plasma membrane. Plant Physiology.166: 125-138*

Chevalier AS, Chaumont F*. *2015*.** *Trafficking of Plant Plasma Membrane Aquaporins: Multiple Regulation Levels and Complex Sorting Signals. Plant and Cell Physiology* ***56*: 819–829.*

Chevin L-M, Gallet R, Gomulkiewicz R, Holt RD, Fellous S*. *2012*.** *Phenotypic plasticity in evolutionary rescue experiments. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* ***368*: 20120089–20120089.*

Chevin L-M, Lande R*. *2009*.** *When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? Evolution* ***64*: 1143–1150.*

Chiba S*. *1997*.** *Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* ***61*: 1233–1239.*

Chinnusamy V, Zhu J-K*. *2009*.** *Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology* ***12*: 133–139.*

Chitarra W, Balestrini R, Vitali M, et al. 2014*.** *Gene expression in vessel-associated cells upon xylem embolism repair in Vitis vinifera L. petioles. Planta.*239****: 887-899.*

Chmura DJ, Anderson PD, Howe GT, et al. 2011*.** *Forest responses to climate change in the northwestern United States: Ecophysiological foundations for adaptive management. Forest Ecology and Management* ***261*: 1121–1142.*

Choudhary NL, Sairam RK, Tyagi A*. *2005*.** *Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (Oryza sativa L.). Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* ***42*: 366–370.*

***Cisneros J, Oki T, Arnell NW, et al. 2014*.** *Freshwater resources. In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M.*

Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L.White (eds.)]. In: Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 229–269.

***Clauw P, Coppens F, De Beuf K, et al. 2015**. Leaf Responses to Mild Drought Stress in Natural Variants of Arabidopsis. Plant Physiology **167**: 800–816.*

***Cobbett C, Goldsbrough P**. **2002**. Pytochelatins and Metallothioneins : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. Annual Review of Plant Biology **53**: 159–182.*

***Cochard H, Bréda N, Granier A, Aussenac G**. **1992**. Vulnerability to air embolism of three European oak species (Quercus petraea (Matt) Liebl, Q pubescens Willd, Q robur L). Annales des Sciences Forestières **49**: 225–233.*

***Cochard H, Casella E, Mencuccini M**. **2007**. Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. Tree Physiology **27**: 1761–1767.*

***Cochard et Granier**. **1999**. Fonctionnement hydraulique des arbres forestiers.*

***Cochard H, Nardini A, Coll L**. **2004**. Hydraulic architecture of leaf blades: where is the main resistance? Plant, Cell and Environment **27**: 1257–1267.*

***Cochard H, Venisse J-S, Barigah TS, et al. 2006**. Putative Role of Aquaporins in Variable Hydraulic Conductance of Leaves in Response to Light. Plant Physiology **143**: 122–133.*

***Cocozza C, Cherubini P, Regier N, Saurer M, Frey B, Tognetti R**. **2010**. Early effects of water deficit on two parental clones of Populus nigra grown under different environmental conditions. Functional Plant Biology **37**: 244.*

***Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Tisserant E, et al. 2010**. Comparative transcriptomics of drought responses in Populus: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. BMC Genomics **11**.*

***Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Vialet-Chabrand S, et al. 2013**. Developmental and Environmental Regulation of Aquaporin Gene Expression across Populus Species: Divergence or Redundancy? (MA Blazquez, Ed.). Plos One **8**: e55506.*

***Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C**. **2008**. Over-expression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **53**: 53–64.*

***Conde A, Chaves MM, Geros H**. **2011**. Membrane Transport, Sensing and Signaling in Plant Adaptation to Environmental Stress. Plant and Cell Physiology **52**: 1583–1602.*

***Cook BI, Wolkovich EM, Davies TJ, et al. 2012**. Sensitivity of Spring Phenology to Warming Across Temporal and Spatial Climate Gradients in Two Independent Databases. Ecosystems **15**: 1283–1294.*

***Cormier L, Barbey R, Kuras L**. **2010**. Transcriptional plasticity through differential assembly of a multiprotein activation complex. Nucleic Acids Research **38**: 4998–5014.*

Cornic G*. *2000. *Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. Trends in Plant Science* ***5****: 187–188.*

Cossu RM, Giordani T, Cavallini A, Natali L*. *2013. *High-throughput analysis of transcriptome variation during water deficit in a poplar hybrid: a general overview. Tree Genetics & Genomes* ***10****: 53–66.*

Cossu RM, Giordani T, Cavallini A, Natali L*. *2014. *High-throughput analysis of transcriptome variation during water deficit in a poplar hybrid: a general overview. Tree Genetics & Genomes* ***10****: 53–66.*

Coupel-Ledru A, Lebon E, Christophe A, et al. 2014. *Genetic variation in a grapevine progeny (Vitis vinifera L. cvs GrenachexSyrah) reveals inconsistencies between maintenance of daytime leaf water potential and response of transpiration rate under drought. Journal of Experimental Botany* ***65****: 6205–6218.*

Couso LL, Fernandez RJ*. *2012. *Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. Annals of Botany* ***110****: 849–857.*

Covarrubias AA, Ayala JW, Reyes JL, Hernandez M, Garciarrubio A*. *1995. *Cell-Wall Proteins Induced by Water Deficit in Bean (Phaseolus vulgaris L.) Seedlings. Plant Physiology* ***107****: 1119–1128.*

Crick JC, Grime JP*. *1987. *Morphological plasticity and mineral nutrient capture in two herbaceous species of contrasted ecology. New Phytologist* ***107****: 403–414.*

Cruiziat P, Cochard H, Ameglio T*. *2002. *Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. Annals of Forest Science* ***59****: 723–752.*

Cruiziat P, Tyree MT*. *1990. *La montee de la seve dans les arbres. La Recherche* ***21****: 406–414.*

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR*. *2010. *Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annual Review of Plant Biology* ***61****: 651–679.*

Cutler JM, Shahan KW, Steponkus PL*. *1980. *Influence of Water Deficits and Osmotic Adjustment on Leaf Elongation in Rice1. Crop Science* ***20****: 314–318.*

Dai A*. *2011. *Drought under global warming: a review. Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* ***2****: 45–65.*

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, et al. 1999. *Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. The Plant Cell* ***11****: 1253–1266.*

Dale VH, Tharp ML, Lannom KO, Hodges DG*. *2010. *Modeling transient response of forests to climate change. Science of The Total Environment* ***408****: 1888–1901.*

Dalmaris E, Ramalho CE, Poot P, Veneklaas EJ, Byrne M*. *2015. *A climate change context for the decline of a foundation tree species in south-western Australia: insights from phylogeography and species distribution modelling. Annals of Botany* ***116****: 941–952.*

***Dambrine E, Martin F, Carisey N, Granier A, Hällgren J-E, Bishop K*. *1995*. *Xylem sap composition: A tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. Plant and Soil **168–169**: 233–241.*

***Danielson JÅ, Johanson U*. *2008*. *Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss Physcomitrella patens. BMC Plant Biology **8**: 45.*

***Darwin C*. *1859*. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. Université d'Oxford: J. Murray.*

***Davenport R*. *2002*. *Glutamate Receptors in Plants. Annals of Botany **90**: 549–557.*

***Davis J, Brandizzi F, Liepman AH, Keegstra K*. *2010*. *Arabidopsis mannan synthase CSLA9 and glucan synthase CSLC4 have opposite orientations in the Golgi membrane: Hemicellulosic glycan synthase topology. The Plant Journal **64**: 1028–1037.*

***Davis SD, Ewers FW, Sperry JS, Portwood KA, Crocker MC, Adams GC*. *2002*. *Shoot dieback during prolonged drought in Ceanothus (Rhamnaceae) chaparral of California: a possible case of hydraulic failure. American Journal of Botany **89**: 820–828.*

***Davletova S*. *2005*. *The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in Arabidopsis. Plant Physiology **139**: 847–856.*

***DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS*. *1998*. *Costs and limits of phenotypic plasticity. Trends in Ecology & Evolution **13**: 77–81.*

***Dickmann D*. *2006*. *Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: Then and now. Biomass and Bioenergy **30**: 696–705.*

***Distler J, Mansouri K, Mayer G, Stockmann M, Piepersberg W*. *1992*. *Streptomycin biosynthesis and its regulation in Streptomycetes. Gene **115**: 105–111.*

***Donovan L, Linton M, Richards J*. *2001*. *Predawn plant water potential does not necessarily equilibrate with soil water potential under well-watered conditions. Oecologia **129**: 328–335.*

***Doxford SW, Freckleton RP*. *2012*. *Changes in the large-scale distribution of plants: extinction, colonisation and the effects of climate: Changes in the large-scale distribution of plants. Journal of Ecology **100**: 519–529.*

***Du Z-Y, Chen M-X, Chen Q-F, Xiao S, Chye M-L*. *2013*. *Overexpression of Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACBP2 enhances drought tolerance: Arabidopsis ACBP2 is ABA responsive. Plant, Cell & Environment **36**: 300–314.*

***Du S-Y, Zhang X-F, Lu Z, et al. 2012*. *Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. Plant Molecular Biology **80**: 519–537.*

***Duan B, Li Y, Zhang X, Korpelainen H, Li C*. *2009*. *Water deficit affects mesophyll limitation of leaves more strongly in sun than in shade in two contrasting Picea asperata populations. Tree Physiology **29**: 1551–1561.*

***Durand TC, Sergeant K, Renaut J, et al. 2011*. *Poplar under drought: Comparison of leaf and cambial proteomic responses. Journal of Proteomics **74**: 1396–1410.*

***Early R, Sax DF*. *2014*. *Climatic niche shifts between species' native and naturalized ranges raise concern for ecological forecasts during invasions and climate change: Niche shift during naturalization. Global Ecology and Biogeography **23**: 1356–1365.*

***Ebine K, Ueda T*. *2015*. *Roles of membrane trafficking in plant cell wall dynamics. Frontiers in Plant Science **6**: 1–7.*

***Efroni I, Eshed Y, Lifschitz E*. *2010*. *Morphogenesis of Simple and Compound Leaves: A Critical Review. The Plant Cell **22**: 1019–1032.*

***Elhiti M, Stasolla C*. *2009*. *Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. Plant Signaling & Behavior **4**: 86–88.*

***Ellgaard L, Helenius A*. *2003*. *Quality control in the endoplasmic reticulum. Nature Reviews Molecular Cell Biology **4**: 181–191.*

***Erickson RO, Michelini F. 1957**. The plastochron index. Am. J. Bot. **44**: 297–305.*

***Erwin DH, Davidson EH*. *2009*. *The evolution of hierarchical gene regulatory networks. Nature Reviews Genetics **10**: 141–148.*

***Evans RD, Black RA, Loescher WH, Fellows RJ*. *1992*. *Osmotic relations of the drought-tolerant shrub Artemisia tridentata in response to water stress. Plant, Cell and Environment **15**: 49–59.*

***Fabbrini F, Gaudet M, Bastien C, et al. 2012**. Phenotypic plasticity, QTL mapping and genomic characterization of bud set in black poplar. BMC Plant Biology **12**: 47.*

***Faivre-Rampant P, Zaina G, Jorge V, et al. 2016**. New resources for genetic studies in Populus nigra : genome-wide SNP discovery and development of a 12k Infinium array. Molecular Ecology Resources **16**: 1023–1036.*

***Falgueras J, Lara AJ, Fernandez-Pozo N, Canton FR, Perez-Trabado G, Claros MG*. *2010*. *SeqTrim: a high-throughput pipeline for preprocessing any type of sequence reads. BMC Bioinformatics **11**: 38.*

***Falk W, Hempelmann N*. *2013*. *Species Favourability Shift in Europe due to Climate Change: A Case Study for Fagus sylvatica L. and Picea abies (L.) Karst. Based on an Ensemble of Climate Models. Journal of Climatology **2013**: 1–18.*

***Fang Z, Cui X*. *2011*. *Design and validation issues in RNA-seq experiments. Briefings in Bioinformatics **12**: 280–287.*

***Fang ZF, Skvortsov AK*. *1999*. *Salicaceae In: Flora of China. St Louis, Missouri: Wu Z. -Y. and Raven, P.H., 162–274.*

***FAO*. *2008*. *Les Peupliers, les Saules et le Bien-être des Populations In: Activités liées à la culture et à l'utilisation du peuplier et du saule de 2004 à 2007. Beijing, Chine, .*

***FAO*. *2009*. *23rd Session of the International Poplar Commission and 44th Session of its Executive Committee. Beijing, China: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.*

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA*. *2009*.** *Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development* ***29*: 185–212.*

Farquhar GD, Raschke K*. *1978*.** *On the Resistance to Transpiration of the Sites of Evaporation within the Leaf. Plant Physiology* ***61*: 1000–1005.*

Feild TS, Brodribb TJ*. *2013*.** *Hydraulic tuning of vein cell microstructure in the evolution of angiosperm venation networks. New Phytologist* ***199*: 720–726.*

Feller U*. *2016*.** *Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. Journal of Plant Physiology* ***203*: 84–94.*

Feller U, Anders I, Mae T*. *2007*.** *Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. Journal of Experimental Botany* ***59*: 1615–1624.*

Fetter K*. *2004*.** *Interactions between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. The Plant Cell Online* ***16*: 215–228.*

Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S, et al. 2010*.** *Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated Populus deltoides × Populus nigra hybrids: Xylem resistance to cavitation and water relations in poplar. Plant, Cell & Environment* ***33*: 1553–1568.*

Fichot R, Brignolas F, Cochard H, Ceulemans R*. *2015*.** *Vulnerability to drought-induced cavitation in poplars: synthesis and future opportunities. Plant, Cell & Environment* ***38*: 1233–1251.*

Flagel LE, Wendel JF*. *2009*.** *Gene duplication and evolutionary novelty in plants. New Phytologist* ***183*: 557–564.*

Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H*. *2002*.** *Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. Functional Plant Biology* ***29*: 461.*

Forde BG, Roberts MR*. *2014*.** *Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? F1000Prime Reports* ***6*.*

Fortunati A, Barta C, Brilli F, et al. 2008*.** *Isoprene emission is not temperature-dependent during and after severe drought-stress: a physiological and biochemical analysis. The Plant Journal* ***55*: 687–697.*

Fotiadis D*. *2000*.** *Structural Characterization of Two Aquaporins Isolated from Native Spinach Leaf Plasma Membranes. Journal of Biological Chemistry* ***276*: 1707–1714.*

Fournier-Level A, Korte A, Cooper MD, Nordborg M, Schmitt J, Wilczek AM*. *2011*.** *A Map of Local Adaptation in Arabidopsis thaliana. Science* ***334*: 86–89.*

Foyer CH, Valadier M-H, Migge A, Becker TW*. *1998*.** *Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. Plant Physiolgy* ***117*: 283–292.*

Fracasso A, Trindade LM, Amaducci S*. *2016*.** *Drought stress tolerance strategies revealed by RNA-Seq in two sorghum genotypes with contrasting WUE. BMC Plant Biology* ***16*.*

Fu A, Chen Y, Li W*. *2006*.** *Analysis on water potential of Populus euphratica oliv and its meaning in the lower reaches of Tarim River, Xinjiang. Chinese Science Bulletin* ***51*: 221–228.*

Fu Y, Poli M, Sablok G, et al. 2016*.** *Dissection of early transcriptional responses to water stress in Arundo donax L. by unigene-based RNA-seq. Biotechnology for Biofuels* ***9*.*

Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, et al. 2011*.** *CYP716A Subfamily Members are Multifunctional Oxidases in Triterpenoid Biosynthesis. Plant and Cell Physiology* ***52*: 2050–2061.*

Gailing O, Vornam B, Leinemann L, Finkeldey R*. *2009*.** *Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. Physiologia Plantarum* ***137*: 509–519.*

Galen C, Rabenold JJ, Liscum E*. *2007*.** *Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in Arabidopsis thaliana. New Phytologist* ***173*: 91–99.*

***Galili G*. *1995*.** *Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. THE PLANT CELL ONLINE 7: 899–906.*

Galmés J, Ochogavía JM, Gago J, Roldán EJ, Cifre J, Conesa M àNgel*. *2013*.** *Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of Solanum lycopersicum : anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters: Anatomical adaptations to water stress in tomato. Plant, Cell & Environment* ***36*: 920–935.*

Gamalei Y*. *1989*.** *Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. Trees* ***3*: 96–110.*

Gao J, Lan T*. *2016*.** *Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from Pinus tabuliformis (Pinaceae) in Escherichia coli. Scientific Reports* ***6*: 19467.*

Gaspar M*. *2003*.** *Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. Plant Science* ***165*: 21–31.*

Gavrilets S, Scheiner SM*. *1993*.** *The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. Journal of Evolutionary Biology* ***6*: 31–48.*

Gebre GM, Kuhns MR, Brandle JR*. *1994*.** *Organic solute accumulation and dehydration tolerance in 3 water stresses Populus deltoides clones. Tree Physiology* ***14*: 575–587.*

Ghalambor CK, Hoke KL, Ruell EW, Fischer EK, Reznick DN, Hughes KA*. *2015*.** *Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. Nature* ***525*: 372–375.*

Ghalambor CK, McKAY JK, Carroll SP, Reznick DN. 2007. *Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. Functional Ecology **21**: 394–407.*

Gifford EM, Foster AS, Foster AS. 1989. *Morphology and evolution of vascular plants. New York: W.H. Freeman and Co.*

Giovannelli A, Deslauriers A, Fragnelli G, et al. 2007. *Evaluation of drought response of two poplar clones (Populus x canadensis Monch —I-214" and P. deltoides Marsh. —Dvina") through high resolution analysis of stem growth. Journal of Experimental Botany **58**: 2673–2683.*

Givnish T. 1988. *Adaptation to Sun and Shade: a Whole-Plant Perspective. Functional Plant Biology **15**: 63–92.*

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2014. *Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science **5**.*

Goodstein DM, Shu S, Howson R, et al. 2012. *Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research **40**: D1178–D1186.*

Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, et al. 2008. *High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Research **36**: 3420–3435.*

Gourcilleau D, Bogeat-Triboulot M-B, Thiec D, et al. 2010. *DNA methylation and histone acetylation: genotypic variations in hybrid poplars, impact of water deficit and relationships with productivity. Annals of Forest Science **67**: 208–208.*

Graham TL. 1998. *Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry **36**: 135–144.*

Grassein F, Till-Bottraud I, Lavorel S. 2010. *Plant resource-use strategies: the importance of phenotypic plasticity in response to a productivity gradient for two subalpine species. Annals of Botany **106**: 637–645.*

Griffiths CA, Gaff DF, Neale AD. 2014. *Drying without senescence in resurrection plants. Frontiers in Plant Science **5**.1-18.*

Guet J, Fichot R, Lédée C, et al. 2015. *Stem xylem resistance to cavitation is related to xylem structure but not to growth and water-use efficiency at the within-population level in Populus nigra L. Journal of Experimental Botany **66**: 4643–4652.*

Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S. 2013. *Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **64**: 1755–1767.*

Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT. 2011. *On the origins of nitric oxide. Trends in Plant Science **16**: 160–168.*

Haake V. 2002. *Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in Arabidopsis. PLANT PHYSIOLOGY **130**: 639–648.*

Hachez C, Besserer A, Chevalier AS, Chaumont F*. *2013*. *Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. Trends in Plant Science **18**: 344–352.

Hachez C, Heinen RB, Draye X, Chaumont F*. *2008a*. *The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. Plant Molecular Biology **68**: 337–353.

Hachez C, Heinen RB, Draye X, Chaumont F*. *2008b*. *The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. Plant Molecular Biology **68**: 337–353.

Hachez C, Laloux T, Reinhardt H, et al. 2014*. *Arabidopsis SNAREs SYP61 and SYP121 Coordinate the Trafficking of Plasma Membrane Aquaporin PIP2;7 to Modulate the Cell Membrane Water Permeability. The Plant Cell **26**: 3132–3147.

Hachez C, Veljanovski V, Reinhardt H, et al. 2014*. *The Arabidopsis Abiotic Stress-Induced TSPO-Related Protein Reduces Cell-Surface Expression of the Aquaporin PIP2;7 through Protein-Protein Interactions and Autophagic Degradation. The Plant Cell Online **26**: 4974–4990.

Hacke U, Sauter JJ*. *1996*. *Drought-lnduced Xylem Dysfunction in Petioles, Branches, and Roots of Populus balsamifera L. and Alnus glutinosa (L.) Gaertn. Plant Physiol. **111**: 413–417.

Hallé F, Oldeman RAA, Tomlinson P. B. 1978*. *Tropical trees and forests: an architectural analysis. Berlin: New York : Springer-Verlag.

Hamanishi ET, Barchet GL, Dauwe R, Mansfield SD, Campbell MM*. *2015*. *Poplar trees reconfigure the transcriptome and metabolome in response to drought in a genotype- and time-of-day-dependent manner. BMC Genomics **16**.1-16.

Hamanishi ET, Raj S, Wilkins O, et al. 2010*. *Intraspecific variation in the Populus balsamifera drought transcriptome: Within-species variation in Populus transcriptome. Plant, Cell & Environment **33**: 1742–1755.

Hamanishi ET, Thomas BR, Campbell MM*. *2012*. *Drought induces alterations in the stomatal development program in Populus. Journal of Experimental Botany **63**: 4959–4971.

Han X, Tang S, An Y, Zheng D-C, Xia X-L, Yin W-L*. *2013*. *Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **64**: 4589–4601.

Han S-K, Wagner D*. *2014*. *Role of chromatin in water stress responses in plants. Journal of Experimental Botany **65**: 2785–2799.

Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K*. *2011*. *Plant dehydrins and stress tolerance. Plant Signaling & Behavior **6**: 1503–1509.

Hannah MA*. *2006*. *Natural Genetic Variation of Freezing Tolerance in Arabidopsis. PLANT PHYSIOLOGY **142**: 98–112.

***Hara M, Sugano Y, Kuboi T*. *2003*. *Drought-regulated expression of prolyl-tRNA synthetase genes in radish (Raphanus sativus) seedlings. Plant Science **165**: 129–137.*

***Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A*. *2010*. *Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. PLANT PHYSIOLOGY **154**: 1254–1271.*

***Hare PD, Cress WA, Van Staden J*. *1998*. *Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment **21**: 535–553.*

***Hargreaves AL, Samis KE, Eckert CG*. *2014*. *Are Species' Range Limits Simply Niche Limits Writ Large? A Review of Transplant Experiments beyond the Range. The American Naturalist **183**: 157–173.*

***Hartmann H, Ziegler W, Kolle O, Trumbore S*. *2013*. *Thirst beats hunger – declining hydration during drought prevents carbon starvation in Norway spruce saplings. New Phytologist **200**: 340–349.*

***He C, Zhang J, Liu X, et al. 2015*. *Identification of genes involved in biosynthesis of mannan polysaccharides in Dendrobium officinale by RNA-seq analysis. Plant Molecular Biology **88**: 219–231.*

***Henry HAL, Aarssen LW*. *1997*. *On the Relationship between Shade Tolerance and Shade Avoidance Strategies in Woodland Plants. Oikos **80**: 575.*

***Herrmann KM*. *1995*. *The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. The Plant Cell 7: 907–919.*

***Hickler T, Vohland K, Feehan J, et al. 2012*. *Projecting the future distribution of European potential natural vegetation zones with a generalized, tree species-based dynamic vegetation model: Future changes in European vegetation zones. Global Ecology and Biogeography **21**: 50–63.*

***Hobo T, Kowyama Y, Hattori T*. *1999*. *A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 15348–15353.*

***Hoffman A*. *1999*. *Taxane and ABA Production in Yew under Different Soil Water Regimes. Hort Science **34**: 882–885.*

***Holbrook NM, Zwieniecki MA*. *1999*. *Embolism Repair and Xylem Tension: Do We Need a Miracle? Plant Physiology **120**: 7–10.*

***Hou Q, Ufer G, Bartels D*. *2016*. *Lipid signalling in plant responses to abiotic stress: Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. Plant, Cell & Environment **39**: 1029–1048.*

***Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A*. *2016*. *The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. Frontiers in Plant Science 7:1-18.*

***Hove RM, Ziemann M, Bhave M*. *2015*. *Identification and Expression Analysis of the Barley (Hordeum vulgare L.) Aquaporin Gene Family (R Aroca, Ed.). PLOS ONE.**293**: 1002-1009.*

Hsiao TC*. *1973*. *Plant responses to water stress. Annual Review of Plant Physiology* ***24*: 519–570.*

Huang G-T, Ma S-L, Bai L-P, et al. 2012*. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports* ***39****: 969–987.*

Hughes L*. *2000*. *Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? Trends in Ecology & Evolution* ***15*: 56–61.*

Hukin D, Cochard H, Dreyer E, Le Thiec D, Bogeat-Triboulot MB*. *2005*. *Cavitation vulnerability in roots and shoots: does Populus euphratica Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? Journal of Experimental Botany* ***56*: 2003–2010.*

Hurst CH, Hemsley PA*. *2015*. *Current perspective on protein S-acylation in plants: more than just a fatty anchor? Journal of Experimental Botany* ***66*: 1599–1606.*

Hussain M, Malik MA, Farooq M, Ashraf MY, Cheema MA*. *2008*. *Improving Drought Tolerance by Exogenous Application of Glycinebetaine and Salicylic Acid in Sunflower. Journal of Agronomy and Crop Science* ***194*: 193–199.*

***Husson F, Josse J, Le S, Mazet J*. *2016*. *FactoMineR: multivariate exploratory data analysis and data mining. Agrocampus-ouest, France.*

Hwang I, Sheen J, Müller B*. *2012*. *Cytokinin Signaling Networks. Annual Review of Plant Biology* ***63*: 353–380.*

Iogna PA, Bucci SJ, Scholz FG, Goldstein G*. *2013*. *Homeostasis in leaf water potentials on leeward and windward sides of desert shrub crowns: water loss control vs. high hydraulic efficiency. Oecologia* ***173*: 675–687.*

***Isebrands JG, Richardson J*. *2014*. *Poplar and willow - Trees for society and the environment. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and CABI. Roma, Boston.*

Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE*. *2000*. *Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. Trends in Plant Science* ***5*: 482–488.*

Jain A, Connolly EL*. *2013*. *Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. Frontiers in Plant Science* ***4*:1-6.*

Jajic I, Sarna T, Strzalka K*. *2015*. *Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. Plants* ***4*: 393–411.*

Jarzyniak KM, Jasinski M*. *2014*. *Membrane transporters and drought resistance - a complex issue. Frontiers in Plant Science* ***5*:1-15.*

Javot H*. *2003*. *Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake. THE PLANT CELL ONLINE* ***15*: 509–522.*

Jensen MK, Lindemose S, de Masi F, et al. 2013. *ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in Arabidopsis thaliana. FEBS open bio* ***3****: 321–327.*

Jeong JS, Park YT, Jung H, Park S-H, Kim J-K. ***2009***. *Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. Plant Biotechnology Reports* ***3****: 127–134.*

Jiang Y, Deyholos MK. ***2009***. *Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. Plant Molecular Biology* ***69****: 91–105.*

Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P. ***1998***. *Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. The Plant Cell* ***10****: 451–459.*

John GP, Scoffoni C, Sack L. ***2013***. *Allometry of cells and tissues within leaves. American Journal of Botany* ***100****: 1936–1948.*

Johnson DM, Meinzer FC, Woodruff DR, Mcculloh KA. ***2009***. *Leaf xylem embolism, detected acoustically and by cryo-SEM, corresponds to decreases in leaf hydraulic conductance in four evergreen species. Plant, Cell & Environment* ***32****: 828–836.*

Johnson JD, Tognetti R, Paris P. ***2002***. *Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO2. Physiologia Plantarum* ***115****: 93–100.*

Jones HG. ***1998***. *Stomatal control of photosynthesis and transpiration. Journal of Experimental Botany* ***49****: 387–398.*

Joshi V, Jander G. ***2009***. *Arabidopsis Methionine -Lyase Is Regulated According to Isoleucine Biosynthesis Needs But Plays a Subordinate Role to Threonine Deaminase. Plant Physiology* ***151****: 367–378.*

Joshi V, Joung J-G, Fei Z, Jander G. ***2010***. *Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. Amino Acids* ***39****: 933–947.*

Joshi R, Wani SH, Singh B, et al. 2016. *Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. Frontiers in Plant Science* ***7****.*

Jouhet J. ***2013***. *Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. Frontiers in Plant Science* ***4****.*

Kaldenhoff R, Kai L, Uehlein N. ***2014***. *Aquaporins and membrane diffusion of CO2 in living organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* ***1840****: 1592–1595.*

Kang J, Choi H, Im M, Kim SY. ***2002***. *Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. The Plant Cell* ***14****: 343–357.*

Kaplan B, Sherman T, Fromm H. ***2007***. *Cyclic nucleotide-gated channels in plants. FEBS Letters* ***581****: 2237–2246.*

Kasprzewska A*. *2003. *Plant chitinases--regulation and function. Cellular & Molecular Biology Letters* ***8****: 809–824.*

Katiyar A, Smita S, Lenka S, Rajwanshi R, Chinnusamy V, Bansal K*. *2012. *Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. BMC Genomics* ***13****: 544.*

Katoh A*. *2006. *Early Steps in the Biosynthesis of NAD in Arabidopsis Start with Aspartate and Occur in the Plastid. Plant Physiology* ***141****: 851–857.*

Kavi Kishor PB*. *2015. *Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. Frontiers in Plant Science* ***6****.*

Kawecki TJ, Ebert D*. *2004. *Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters* ***7****: 1225–1241.*

Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ*. *2000. *The Role of Pyruvate Dehydrogenase and Acetyl-Coenzyme A Synthetase in Fatty Acid Synthesis in Developing Arabidopsis Seeds. Plant Physiology* ***123****: 497–508.*

Kenzo T, Ichie T, Watanabe Y, Hiromi T*. *2007. *Ecological distribution of homobaric and heterobaric leaves in tree species of Malaysian lowland tropical rainforest. American Journal of Botany* ***94****: 764–775.*

Kenzo T, Ichie T, Yoneda R, et al. 2004. *Interspecific variation of photosynthesis and leaf characteristics in canopy trees of five species of Dipterocarpaceae in a tropical rain forest. Tree Physiology* ***24****: 1187–1192.*

Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum NA, Khan NA*. *2015. *Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. Frontiers in Plant Science* ***6****.*

Kim JS, Park H-M, Chae S, et al. 2014. *A Pepper MSRB2 Gene Confers Drought Tolerance in Rice through the Protection of Chloroplast-Targeted Genes (GK Pandey, Ed.). PLoS ONE* ***9****: e90588.*

Kim J-M, To TK, Ishida J, et al. 2008. *Alterations of Lysine Modifications on the Histone H3 N-Tail under Drought Stress Conditions in Arabidopsis thaliana. Plant and Cell Physiology* ***49****: 1580–1588.*

Knepper C, Savory EA, Day B*. *2011. *Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion. Plant Physiology* ***156****: 286–300.*

Knight H, Knight MR*. *2001. *Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. Trends in Plant Science* ***6****: 262–267.*

Knoblauch M, Peters WS*. *2010. *Münch, morphology, microfluidics - our structural problem with the phloem: Münch, morphology, microfluidics. Plant, Cell & Environment* ***33****: 1439–1452.*

Koag M-C, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ*. *2003. *The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. Plant Physiology* ***131****: 309–316.*

***Koch PL, Barnosky AD*. *2006*. *Late Quaternary Extinctions: State of the Debate. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **37**: 215–250.*

***Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F*. *2004*. *Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. New Phytologist **164**: 83–93.*

***Komis G, Apostolakos P, Galatis B*. *2002*. *Hyperosmotic stress induces formation of tubulin macrotubules in root-tip cells of Triticum turgidum: their probable involvement in protoplast volume control. Plant & Cell Physiology **43**: 911–922.*

***Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch H-H, Bartels D*. *2006*. *Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in Arabidopsis thaliana confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. Plant, Cell & Environment **29**: 1033–1048.*

***Krasensky J, Jonak C*. *2012*. *Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimental Botany **63**: 1593–1608.*

***Ksouri N, Jiménez S, Wells CE, Contreras-Moreira B, Gogorcena Y*. *2016*. *Transcriptional Responses in Root and Leaf of Prunus persica under Drought Stress Using RNA Sequencing. Frontiers in Plant Science 7.*

***Kumar R, Arya GC, Bisht NC*. *2014*. *Differential Expression and Interaction Specificity of the Heterotrimeric G-Protein Family in Brassica nigra Reveal their Developmental- and Condition-Specific Roles. Plant and Cell Physiology **55**: 1954–1968.*

***Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM, Hartig A*. *2006*. *A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**: 1441–1452.*

***Laloi C, Apel K, Danon A*. *2004*. *Reactive oxygen signalling: the latest news. Current Opinion in Plant Biology 7: 323–328.*

***Lambers H, Chapin FS, Pons TL*. *1998*. *Photosynthesis, Respiration, and Long-Distance Transport In: Plant Physiological Ecology. New York, NY: Springer New York, 10–153.*

***Lambers H, Chapin FS, Pons TL*. *2008*. *Plant physiological ecology. New York, NY: Springer New York.*

***Lambs L, Loubiat M, Girel J, Tissier J, Peltier J-P, Marigo G*. *2006*. *Survival and acclimation of Populus nigra to drier conditions after damming of an alpine river, southeast France. Annals of Forest Science **63**: 377–385.*

***Lamy J-B, Delzon S, Bouche PS, et al. 2014*. *Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. New Phytologist **201**: 874–886.*

***Landmann G, Dupouey J-L, Badeau V, et al. 2008*. *Le hêtre face aux changements climatiques. F o r ê t - e n t r e p r i s e: 28–33.*

***Landry CR, Oh J, Hartl DL, Cavalieri D. 2006**. Genome-wide scan reveals that genetic variation for transcriptional plasticity in yeast is biased towards multi-copy and dispensable genes. Gene **366**: 343–351.*

***Larcheveque M, Maurel M, Desrochers A, Larocque GR. 2011**. How does drought tolerance compare between two improved hybrids of balsam poplar and an unimproved native species? Tree Physiology **31**: 240–249.*

***Lavorel S, Gachet S, Sahl A, Gaucherand S, Bonet R. 2009**. A plant functional traits data base for the Alps: understanding functional effects of changed grassland management. In: Data Mining for Global Trends in Mountain Biodiversity. Boca Raton: CRC Press, 181.*

***Lawlor DW. 2002**. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. Annals of Botany **89**: 871–885.*

***Le Cao K-A, Gonzalez I, Dejean S. 2009**. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. Bioinformatics **25**: 2855–2856.*

***Lê S, Josse J, Husson F. 2008. FactoMineR** : An R package for multivariate analysis. Journal of Statistical Software **25**.*

***Le DT, Tarrago L, Watanabe Y, et al. 2013**. Diversity of Plant Methionine Sulfoxide Reductases B and Evolution of a Form Specific for Free Methionine Sulfoxide (LES Netto, Ed.). PLoS ONE **8**: e65637.*

***Lebart L, Morineau A, Piron M. 1995**. Statistique exploratoire multidimensionnelle. Paris: Dunod.*

***Lecoeur J. 2007**. Water deficit impact on crops. Montpellier SupAgro.*

***Lecoeur J, Wery J, Turc O, Tardieu F. 1995**. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. Journal of Experimental Botany **46**: 1093–1101.*

***Lee HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I, Kim WT. 2009**. Drought Stress-Induced Rma1H1, a RING Membrane-Anchor E3 Ubiquitin Ligase Homolog, Regulates Aquaporin Levels via Ubiquitination in Transgenic Arabidopsis Plants. THE PLANT CELL ONLINE **21**: 622–641.*

***Lee S-J, Kang J-Y, Park H-J, et al. 2010**. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. Plant Physiology **153**: 716–727.*

***Lee S, Seo PJ, Lee H-J, Park C-M. 2012**. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **70**: 831–844.*

***Leitch V, Agre P, King LS. 2001**. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**: 2894–2898.*

***Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, et al. 2013**. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Frontiers in Plant Science **4**.*

Lenoir J, Gegout JC, Marquet PA, de Ruffray P, Brisse H. ***2008***. *A Significant Upward Shift in Plant Species Optimum Elevation During the 20th Century. Science* ***320****: 1768–1771.*

Leshem Y, Golani Y, Kaye Y, Levine A. ***2010***. *Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in Arabidopsis reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure. Journal of Experimental Botany* ***61****: 2615–2622.*

Less H, Galili G. ***2008***. *Principal Transcriptional Programs Regulating Plant Amino Acid Metabolism in Response to Abiotic Stresses. Plant Physiology* ***147****: 316–330.*

Li H, Durbin R. ***2010***. *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics* ***26****: 589–595.*

Li D-D, Ruan X-M, Zhang J, Wu Y-J, Wang X-L, Li X-B. ***2013***. *Cotton plasma membrane intrinsic protein 2s (PIP2s) selectively interact to regulate their water channel activities and are required for fibre development. New Phytologist* ***199****: 695-707.*

Li R, Wang J, Li S, et al. 2016. *Plasma Membrane Intrinsic Proteins SlPIP2;1, SlPIP2;7 and SlPIP2;5 Conferring Enhanced Drought Stress Tolerance in Tomato. Scientific Reports* ***6****: 31814.*

Lin M, Oliver DJ. ***2008***. *The Role of Acetyl-Coenzyme A Synthetase in Arabidopsis. Plant Physiology* ***147****: 1822–1829.*

Lin W, Peng Y, Li G, et al. 2007. *Isolation and functional characterization of PgTIP1, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. Journal of Experimental Botany* ***58****: 947–956.*

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. 1998. *Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and LowTemperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. The Plant Cell* ***10****: 1391–1406.*

Liu C, Liu Y, Guo K, et al. 2011. *Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. Environmental and Experimental Botany* ***71****: 174–183.*

Liu Q, Qiao F, Ismail A, Chang X, Nick P. ***2013***. *The plant cytoskeleton controls regulatory volume increase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* ***1828****: 2111–2120.*

Liu H, Sultan MARF, Liu X li, Zhang J, Yu F, Zhao H xian. ***2015***. *Physiological and Comparative Proteomic Analysis Reveals Different Drought Responses in Roots and Leaves of Drought-Tolerant Wild Wheat (Triticum boeoticum) (K Wu, Ed.). PLOS ONE* ***10****: e0121852.*

Lopez D, Amira MB, Brown D, et al. 2016. *The Hevea brasiliensis XIP aquaporin subfamily: genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting. Plant Molecular Biology* ***91****: 375–396.*

Lopez D, Bronner G, Brunel N, et al. 2012. *Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. Journal of Experimental Botany* ***63****: 2217–2230.*

Lopez D, Venisse J-S, Fumanal B, et al. 2013. *Aquaporins and Leaf Hydraulics: Poplar Sheds New Light. Plant and Cell Physiology* ***54****: 1963–1975.*

Lortie CJ, Aarssen LW. ***1996***. *The Specialization Hypothesis for Phenotypic Plasticity in Plants. International Journal of Plant Sciences* ***157****: 484–487.*

Love MI, Huber W, Anders S. ***2014***. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology* ***15****.*

Lu P, Biron P, Granier A, Cochard H. ***1996***. *Water relations of adult Norway spruce (Picea abies (L) Karst) under soil drought in the Vosges mountains: whole-tree hydraulic conductance, xylem embolism and water loss regulation. Annales des Sciences Forestières* ***53****: 113–121.*

Lu M, Ying S, Zhang D-F, et al. 2012. *A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic Arabidopsis. Plant Cell Reports* ***31****: 1701–1711.*

Luu D-T, Maurel C. ***2013***. *Aquaporin Trafficking in Plant Cells: An Emerging Membrane-Protein Model: Aquaporin Trafficking in Plant Cells. Traffic* ***14****: 629–635.*

Lynch DJ, McInerney FA, Kouwenberg LLR, Gonzalez-Meler MA. ***2012***. *Plasticity in bundle sheath extensions of heterobaric leaves. American Journal of Botany* ***99****: 1197–1206.*

Lynch DV, Steponkus PL. ***1987***. *Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (Secale cereale L. cv Puma). Plant Physiology****83****: 761–767.*

Mahajan S, Tuteja N. ***2005***. *Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics* ***444****: 139–158.*

Maksymowych R. ***1973***. *Analysis of Leaf Development. Cambridge University Press.*

van Mantgem PJ, Stephenson NL, Byrne JC, et al. 2009. *Widespread increase of tree mortality rates in the western United States. Science* ***323****: 521–524.*

Marchese JA, Ferreira JFS, Rehder VLG, Rodrigues O. ***2010***. *Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood(Artemisia annua L., Asteraceae). Brazilian Journal of Plant Physiology* ***22****: 1–9.*

Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. ***2008***. *RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Research* ***18****: 1509–1517.*

Marjanović Ţ, Uehlein N, Kaldenhoff R, et al. 2005. *Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! Planta* ***222****: 258–268.*

Marks B, Stowell MHB, Vallis Y, et al. 2001. *GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. Nature* ***410****: 231–235.*

Marron N, Delay D, Petit J-M, et al. 2002. *Physiological traits of two Populus x euramericana clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. Tree Physiology* ***22****: 849–858.*

Marron N, Dreyer E, Boudouresque E, et al. 2003. *Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two Populus x canadensis (Moench) clones, ―Dorskamp" and "Luisa_Avanzo." Tree Physiology* ***23****: 1225–1235.*

Marron N, Maury S, Rinaldi C, Brignolas F. ***2006***. *Impact of drought and leaf development stage on enzymatic antioxidant system of two Populus deltoides × nigra clones. Annals of Forest Science* ***63****: 323–327.*

Marshall A, Aalen RB, Audenaert D, et al. 2012. *Tackling Drought Stress: RECEPTOR-LIKE KINASES Present New Approaches. The Plant Cell* ***24****: 2262–2278.*

Martín ML, Busconi L. ***2000***. *Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* ***24****: 429–435.*

Martin LBB, Fei Z, Giovannoni JJ, Rose JKC. ***2013***. *Catalyzing plant science research with RNA-seq. Frontiers in Plant Science* ***4****.*

Martorell S, Medrano H, Tomàs M, Escalona JM, Flexas J, Diaz-Espejo A. ***2014***. *Plasticity of vulnerability to leaf hydraulic dysfunction during acclimation to drought in grapevines: an osmotic-mediated process. Physiologia Plantarum* ***153****: 381–91.*

Martre P. ***2002***. *Plasma Membrane Aquaporins Play a Significant Role during Recovery from Water Deficit. PLANT PHYSIOLOGY* ***130****: 2101–2110.*

Masojídek J, Trivedi T, Halshaw L, Alexiou A, Hall DO. ***1991***. *The Synergistic Effect of Drought and Light Stresses in Sorghum and Pearl Millet. Plant Physiology* ***96****: 198–207.*

Maurel C, Boursiac Y, Luu D-T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L. ***2015***. *Aquaporins in Plants. Physiological Reviews* ***95****: 1321–1358.*

Maurel C., Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ. ***1993***. *The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. The EMBO Journal* ***12****: 2241–2247.*

Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ. ***1993***. *The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. The EMBO Journal* ***12****: 2241–2247.*

Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V. ***2008a***. *Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. Annual Review of Plant Biology* ***59****: 595–624.*

Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V. ***2008b***. *Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. Annual Review of Plant Biology* ***59****: 595–624.*

Maurel C, Verdoucq L, Rodrigues O. ***2016***. *Aquaporins and plant transpiration: Aquaporins and plant transpiration. Plant, Cell & Environment.*

Mayak S, Tirosh T, Glick BR. ***2004***. *Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. Plant Science* ***166****: 525–530.*

McCully ME. ***1999***. *Root Xylem Embolisms and Refilling. Relation to Water Potentials of Soil, Roots, and Leaves, and Osmotic Potentials of Root Xylem Sap. Plant Physiology* ***119****: 1001–1008.*

McDowell NG. ***2011***. *Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. Plant Physiology* ***155****: 1051–1059.*

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, et al. 2008. *Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? New Phytologist* ***178****: 719–739.*

McDowell NG, Sevanto S. ***2010***. *The mechanisms of carbon starvation: how, when, or does it even occur at all?: Commentary. New Phytologist* ***186****: 264–266.*

Mcelrone AJ, Bichler J, Pockman WT, Addington RN, Linder CR, Jackson RB. ***2007***. *Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. Plant, Cell & Environment* ***30****: 1411–1421.*

McElrone AJ, Bichler J, Pockman WT, Addington RN, Linder CR, Jackson RB. ***2007***. *Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. Plant, Cell & Environment* ***30****: 1411–1421.*

McKiernan AB, Hovenden MJ, Brodribb TJ, Potts BM, Davies NW, O'Reilly-Wapstra JM. ***2014***. *Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two Eucalyptus species. Environmental and Experimental Botany* ***105****: 55–64.*

McKiernan AB, Potts BM, Brodribb TJ, et al. 2015. *Responses to mild water deficit and rewatering differ among secondary metabolites but are similar among provenances within Eucalyptus species (Ü Niinemets, Ed.). Tree Physiology: tpv106.*

McKown AD, Cochard H, Sack L. ***2010***. *Decoding Leaf Hydraulics with a Spatially Explicit Model: Principles of Venation Architecture and Implications for Its Evolution. The American Naturalist* ***175****: 447–460.*

McKown AD, Guy RD, Klápště J, et al. 2014. *Geographical and environmental gradients shape phenotypic trait variation and genetic structure in Populus trichocarpa. New Phytologist* ***201****: 1263–1276.*

Meidner H. ***1976***. *Water Vapour Loss from a Physical Model of a Substomatal Cavity. Journal of Experimental Botany* ***27****: 691–694.*

Meier ES, Lischke H, Schmatz DR, Zimmermann NE. ***2012***. *Climate, competition and connectivity affect future migration and ranges of European trees: Future migration and ranges of European trees. Global Ecology and Biogeography* ***21****: 164–178.*

Melcher K, Ng L-M, Zhou XE, et al. 2009. *A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. Nature* ***462****: 602–608.*

Mellerowicz E, Sundberg B*. *2008*.** *Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. Current Opinion in Plant Biology* ***11*: 293–300.*

Menzel A, Sparks TH, Estrella N, et al. 2006*.** *European phenological response to climate change matches the warming pattern. Global Change Biology* ***12*: 1969–1976.*

***Mewis I, Khan MAM, Glawischnig E, Schreiner M, Ulrichs C*. *2012*.** *Water Stress and Aphid Feeding Differentially Influence Metabolite Composition in Arabidopsis thaliana (L.) (L-SP Tran, Ed.). PLoS ONE 7: e48661.*

Meyer E, Aspinwall MJ, Lowry DB, et al. 2014*.** *Integrating transcriptional, metabolomic, and physiological responses to drought stress and recovery in switchgrass (Panicum virgatum L.). BMC Genomics* ***15*: 527.*

***Michel J*. *2009*.** *Les zones humides : un enjeu national. Bilan de 15 ans de politiques publiques. Evolution 1990-2000 des zones humides d'importance majeure en termes de superficie et d'état de conservation. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer.*

Micheli F*. *2001*.** *Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends in Plant Science* ***6*: 414–419.*

Milburn JA*. *1966*.** *The conduction of sap: I. Water conduction and cavitation in water stressed leaves. Planta* ***69*: 34–42.*

Miller G, Shulaev V, Mittler R*. *2008*.** *Reactive oxygen signaling and abiotic stress. Physiologia Plantarum* ***133*: 481–489.*

Minic Z*. *2008*.** *Physiological roles of plant glycoside hydrolases. Planta* ***227*: 723–740.*

Mitchell PJ, O'Grady AP, Tissue DT, Worledge D, Pinkard EA*. *2014*.** *Co-ordination of growth, gas exchange and hydraulics define the carbon safety margin in tree species with contrasting drought strategies. Tree Physiology* ***34*: 443–458.*

Miyazawa Y, Takahashi H*. *2007*.** *How do Arabidopsis Roots Differentiate Hydrotropism from Gravitropism? Plant Signaling & Behavior* ***2*: 388–389.*

Miyazawa S-I, Yoshimura S, Shinzaki Y, Maeshima M, Miyake C*. *2008*.** *Deactivation of aquaporins decreases internal conductance to CO_2 diffusion in tobacco leaves grown under long-term drought. Functional Plant Biology* ***35*: 553.*

Miyazono K-I, Miyakawa T, Sawano Y, et al. 2009*.** *Structural basis of abscisic acid signalling. Nature* ***462*: 609–614.*

Mofatto LS, Carneiro F de A, Vieira NG, et al. 2016*.** *Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different Coffea arabica cultivars. BMC Plant Biology* ***16*.*

Møller IM, Sweetlove LJ*. *2010*.** *ROS signalling--specificity is required. Trends in Plant Science* ***15*: 370–374.*

Monclus R, Dreyer E, Villar M, et al. 2006. *Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of Populus deltoides x Populus nigra. New Phytologist* ***169****: 765–777.*

Moon H, Lee B, Choi G, et al. 2003. *NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ***100****: 358–363.*

Morabito D, Caruso A, Carpin S, et al. 2006. *Cambial activity of Populus tremula × Populus alba clone 717-1B4 in hydroponic culture. Canadian Journal of Forest Research* ***36****: 719–724.*

Moran NA. ***1992***. *The Evolutionary Maintenance of Alternative Phenotypes. The American Naturalist* ***139****: 971–989.*

Moremen K, Molinari M. ***2006***. *N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. Current Opinion in Structural Biology* ***16****: 592–599.*

Morin X, Viner D, Chuine I. ***2008***. *Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. Journal of Ecology* ***96****: 784–794.*

Morrissey J, Guerinot ML. ***2009***. *Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. Chemical Reviews* ***109****: 4553–4567.*

Müller I, Wagner W, Völker A, et al. 2003. *Syntaxin specificity of cytokinesis in Arabidopsis. Nature Cell Biology* ***5****: 531–534.*

Münch E. ***1930***. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fischer.*

Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J. ***2001***. *Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in abi1-1 and abi2-1 protein phosphatase 2C mutants. The Plant Cell* ***13****: 2513–2523.*

Naiman and RJ, Décamps H. ***1997***. *The Ecology of Interfaces : Riparian Zones. Annual Review of Ecology and Systematics* ***28****: 621–658.*

Nakamura Y, Tolbert NE. ***1983***. *Serine: glyoxylate, alanine:glyoxylate, and glutamate:glyoxylate aminotransferase reactions in peroxisomes from spinach leaves. The Journal of Biological Chemistry* ***258****: 7631–7638.*

Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. ***1997***. *A nuclear gene, erd1, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* ***12****: 851–861.*

Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. ***2012***. *NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica Et Biophysica Acta* ***1819****: 97–103.*

Nambara E, Kawaide H, Kamiya Y, Naito S*. *1998*.** *Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. Plant & Cell Physiology* ***39*: 853–858.*

Nardini A*. *2001*.** *Xylem Cavitation in the Leaf of Prunus laurocerasus and Its Impact on Leaf Hydraulics. PLANT PHYSIOLOGY* ***125*: 1700–1709.*

Nardini A, Battistuzzo M, Savi T*. *2013*.** *Shoot desiccation and hydraulic failure in temperate woody angiosperms during an extreme summer drought. The New Phytologist* ***200*: 322–329.*

Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S*. *2011*.** *Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading? Plant Science* ***180*: 604–611.*

Nardini A, Tyree MT, Salleo S*. *2001*.** *Xylem Cavitation in the Leaf of Prunus laurocerasus and Its Impact on Leaf Hydraulics. Plant Physiology* ***125*: 1700–1709.*

Nathan R, Horvitz N, He Y, Kuparinen A, Schurr FM, Katul GG*. *2011*.** *Spread of North American wind-dispersed trees in future environments. Ecology Letters* ***14*: 211–219.*

Nawaz Z, Kakar K, Saand MA, Shu Q-Y*. *2014*.** *Cyclic nucleotide-gated ion channel gene family in rice, identification, characterization and experimental analysis of expression response to plant hormones, biotic and abiotic stresses. BMC Genomics* ***15*: 853.*

Neale DB, Ingvarsson PK*. *2008*.** *Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. Current Opinion in Plant Biology* ***11*: 149–155.*

Neill S, Barros R, Bright J, et al. 2008*.** *Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. Journal of Experimental Botany* ***59*: 165–176.*

Ng C, Hetherington AM*. *2001*.** *Sphingolipid-mediated Signalling in Plants. Annals of Botany* ***88*: 957–965.*

Nick P*. *2013*.** *Microtubules, signalling and abiotic stress. The Plant Journal* ***75*: 309–323.*

Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, et al. 2010*.** *Plant phenotypic plasticity in a changing climate. Trends in Plant Science* ***15*: 684–692.*

***Niinemets Ü*. *2015*.** *Uncovering the hidden facets of drought stress: secondary metabolites make the difference (D Way, Ed.). Tree Physiology: tpv128.*

Nilson SE, Assmann SM*. *2010*.** *Heterotrimeric G proteins regulate reproductive trait plasticity in response to water availability. New Phytologist* ***185*: 734–746.*

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S*. *2008*.** *Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. Plant Physiology* ***147*: 1251–1263.*

Noblin X, Mahadevan L, Coomaraswamy IA, Weitz DA, Holbrook NM, Zwieniecki MA*. *2008*.** *Optimal vein density in artificial and real leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***105*: 9140–9144.*

Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A, Saito K. 1998. *Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry* ***273****: 32739–32745.*

Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S. 2013. *Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. Frontiers in Microbiology* ***4****.*

Ohmiya A, Tanaka Y, Kadowaki K, Hayashi T. 1998. *Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. Plant & Cell Physiology* ***39****: 492–499.*

Ohnuma T, Numata T, Osawa T, et al. 2011. *A class V chitinase from Arabidopsis thaliana: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. Planta* ***234****: 123–137.*

Oshlack A, Wakefield MJ. 2009. *Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. Biology Direct* ***4****: 14.*

Otegui MS, Spitzer C. 2008. *Endosomal Functions in Plants. Traffic* ***9****: 1589–1598.*

Otto B, Uehlein N, Sdorra S, et al. 2010. *Aquaporin Tetramer Composition Modifies the Function of Tobacco Aquaporins. Journal of Biological Chemistry* ***285****: 31253–31260.*

Paez Valencia J, Goodman K, Otegui MS. 2016. *Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. Annual Review of Plant Biology* ***67****: 309–335.*

País SM, Téllez-Iñón MT, Daniela Andrea C. 2009. *Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. Plant Signaling & Behavior* ***4****: 1013–1015.*

Pan Y, Birdsey RA, Fang J, et al. 2011. *A Large and Persistent Carbon Sink in the World's Forests. Science* ***333****: 988–993.*

Pandey S, Nelson DC, Assmann SM. 2009. *Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. Cell* ***136****: 136–148.*

Pang YLJ, Poruri K, Martinis SA. 2014. *tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond: Aminoacyl-tRNA synthetases. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* ***5****: 461–480.*

Papageorgiou GC, Murata N. 1995. *The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. Photosynthesis Research* ***44****: 243–252.*

Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F, Tardieu F. 2009. *Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. Plant Physiology* ***149****: 2000–2012.*

Parker J. 1956. *Drought resistance in woody plants. The botanical review* ***22****: 241–289.*

Parmesan C. 2007. *Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. Global Change Biology* ***13****: 1860–1872.*

Parmesan C, Hanley ME*. *2015*.** *Plants and climate change: complexities and surprises. Annals of Botany* ***116*: 849–864.*

Parmesan C, Yohe G*. *2003*.** *A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. Nature* ***421*: 37–42.*

Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ*. *2002*.** *Rubisco activity: effects of drought stress. Annals of Botany* ***89 Spec No*: 833–839.*

Passioura JB*. *2002*.** *Soil conditions and plant growth. Plant, Cell and Environment* ***25*: 311–318.*

Pata MO, Hannun YA, Ng CK-Y*. *2010*.** *Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx: Tansley review. New Phytologist* ***185*: 611–630.*

Paul P, Simm S, Mirus O, Scharf K-D, Fragkostefanakis S, Schleiff E*. *2014*.** *The Complexity of Vesicle Transport Factors in Plants Examined by Orthology Search (G Langsley, Ed.). PLoS ONE* ***9*: e97745.*

Pedrol N, Ramos P, Reigosa MJ*. *2000*.** *Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. Journal of Plant Physiology* ***157*: 383–393.*

***Peer WA*. *2011*.** *Plasma Membrane Protein Trafficking In: Murphy AS, Schulz B, Peer W, eds. The Plant Plasma Membrane. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 31–56.*

Pelah D., Shoseyov O, Altman A, Bartels D*. *1997*.** *Water-stress response in aspen (Populus tremula): Differential accumulation of dehydrin, sucrose synthase, GAPDH homologues, and soluble sugars. Journal of Plant Physiology* ***151*: 96–100.*

Pelah Dan, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D*. *1997*.** *Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. Physiologia Plantarum* ***99*: 153–159.*

Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R*. *2007*.** *Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. Planta* ***226*: 729–740.*

Peng C, Ma Z, Lei X, et al. 2011*.** *A drought-induced pervasive increase in tree mortality across Canada's boreal forests. Nature Climate Change* ***1*: 467–471.*

Peñuelas J, Sardans J, Estiarte M, et al. 2013*.** *Evidence of current impact of climate change on life: a walk from genes to the biosphere. Global Change Biology* ***19*: 2303–2338.*

Peoples MB, Pate JS, Atkins CA, Bergersen FJ*. *1986*.** *Nitrogen Nutrition and Xylem Sap Composition of Peanut (Arachis hypogaea L. cv Virginia Bunch). Plant Physiology* ***82*: 946–951.*

Perez Di Giorgio J, Soto G, Alleva K, et al. 2014*.** *Prediction of Aquaporin Function by Integrating Evolutionary and Functional Analyses. The Journal of Membrane Biology* ***247*: 107–125.*

Pfaffl MW. ***2004***. *Quantification strategies in real-time PCR In: A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA, USA: S.A. Bustin, 87–112.*

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. ***2004***. *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters* ***26****: 509–515.*

Pfautsch S, Renard J, Tjoelker M, Salih A. ***2015***. *Phloem as capacitor- Radial transfer of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. Plant Physiology: pp.114.254581.*

Phillips OL, Aragao LEOC, Lewis SL, et al. 2009. *Drought Sensitivity of the Amazon Rainforest. Science* ***323****: 1344–1347.*

Pickard WF. ***1989***. *How might a tracheary element which is embolized by day be healed by night? Journal of Theoretical Biology* ***141****: 259–279.*

di Pietro M, Vialaret J, Li G-W, et al. 2013. *Coordinated post-translational responses of aquaporins to abiotic and nutritional stimuli in Arabidopsis roots. Molecular & cellular proteomics: MCP* ***12****: 3886–3897.*

Pinheiro C, Chaves MM. ***2011***. *Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? Journal of Experimental Botany* ***62****: 869–882.*

Pinosio S, Giacomello S, Faivre-Rampant P, et al. 2016. *Characterization of the Poplar Pan-Genome by Genome-Wide Identification of Structural Variation. Molecular Biology and Evolution* ***33****: 2706–2719.*

Plavcova L, Hacke UG. ***2012***. *Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. Journal of Experimental Botany* ***63****: 6481–6491.*

Plett JM, Wilkins O, Campbell MM, Ralph SG, Regan S. ***2010***. *Endogenous overexpression of Populus MYB186 increases trichome density, improves insect pest resistance, and impacts plant growth: Poplar MYB186 impacts growth and pest resistance. The Plant Journal* ***64****: 419–432.*

Plomion C, Lalanne C, Claverol S, et al. 2006. *Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. Proteomics* ***6****: 6509–6527.*

Poccia D, Larijani B. ***2009***. *Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. Biochemical Journal* ***418****: 233–246.*

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. ***2006***. *Peroxisomal β-oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* ***1763****: 1413–1426.*

Pou A, Medrano H, Flexas J, Tyerman SD. ***2013***. *A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering: Grapevine leaf conductances and aquaporins. Plant, Cell & Environment* ***36****: 828–843.*

Prado K, Boursiac Y, Tournaire-Roux C, et al. 2013. *Regulation of Arabidopsis Leaf Hydraulics Involves Light-Dependent Phosphorylation of Aquaporins in Veins. Plant Cell* ***25****: 1029–1039.*

Prak S, Hem S, Boudet J, et al. 2008. *Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. Molecular & cellular proteomics: MCP* ***7****: 1019–1030.*

Pratelli R, Pilot G. ***2014***. *Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. Journal of Experimental Botany* ***65****: 5535–5556.*

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. ***1992a***. *Appearance of Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. Science* ***256****: 385–387.*

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. ***1992b***. *Appearance of Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. Science* ***256****: 385–387.*

Price CA, Knox S-JC, Brodribb TJ. ***2013***. *The Influence of Branch Order on Optimal Leaf Vein Geometries: Murray's Law and Area Preserving Branching (RMH Merks, Ed.). PLoS ONE* ***8****: e85420.*

Primack RB, Ibáñez I, Higuchi H, et al. 2009. *Spatial and interspecific variability in phenological responses to warming temperatures. Biological Conservation* ***142****: 2569–2577.*

Pucholt P, Sjödin P, Weih M, Rönnberg-Wästljung AC, Berlin S. ***2015***. *Genome-wide transcriptional and physiological responses to drought stress in leaves and roots of two willow genotypes. BMC Plant Biology* ***15****.*

Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F. ***2001***. *Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. Journal of Experimental Botany* ***52****: 77–84.*

Raj S, Bräutigam K, Hamanishi ET, et al. 2011. *Clone history shapes Populus drought responses. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***108****: 12521–12526.*

Ramakrishnan A, Ravishankar GA. ***2011***. *Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior* ***6****: 1720–1731.*

Rameau J-C, Mansion D, Dumé G. ***1989***. *Flore forestière française: guide écologique illustré. Paris: Institut pour le développement forestier : Ministère de l'agriculture et de la forêt, Direction de l'espace rural et de la forêt : Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts.*

Ranocha P, Dima O, Nagy R, et al. 2013. *Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homoeostasis. Nature Communications* ***4****.*

Rasheed F, Dreyer E, Richard B, Brignolas F, Brendel O, Le Thiec D. ***2014***. *Vapour pressure deficit during growth has little impact on genotypic differences of transpiration efficiency at leaf and whole-plant level: an example from P opulus nigra L.: VPD and the genetic variability of transpiration efficiency in poplar. Plant, Cell & Environment* ***38****: 670-84.*

Rathinasabapathi B, Fouad WM, Sigua CA. ***2001***. *beta-Alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, S-adenosyl-L-methionine-dependent N-methyltransferase from Limonium latifolium leaves. Plant Physiology* ***126****: 1241–1249.*

Rattanakon S, Ghan R, Gambetta GA, Deluc LG, Schlauch KA, Cramer GR. ***2016***. *Abscisic acid transcriptomic signaling varies with grapevine organ. BMC Plant Biology* ***16****.*

Raup DM, Sepkoski JJ. ***1982***. *Mass Extinctions in the Marine Fossil Record. Science* ***215****: 1501–1503.*

Rebetez M, Landeau S, Maurice D, et al. 2006. *Dossier ONF : Expertise sécheresse et canicule 2003.*

Reed TE, Waples RS, Schindler DE, Hard JJ, Kinnison MT. ***2010***. *Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* ***277****: 3391–3400.*

Regier N, Streb S, Cocozza C, et al. 2009. *Drought tolerance of two black poplar (Populus nigra L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. Plant, Cell & Environment* ***32****: 1724–1736.*

Ren X, Chen Z, Liu Y, et al. 2010. *ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis: WRKY transcription factor and drought stress. The Plant Journal* ***63****: 417–429.*

Ricklefs R, Miller GL. ***2005***. *Ecologie. Bruxelles: De Boeck & Larcier.*

Rockwell FE, Holbrook NM, Stroock AD. ***2014***. *The Competition between Liquid and Vapor Transport in Transpiring Leaves. PLANT PHYSIOLOGY* ***164****: 1741–1758.*

Rood SB, Patiño S, Coombs K, Tyree MT. ***2000***. *Branch sacrifice: cavitation-associated drought adaptation of riparian cottonwoods. Trees* ***14****: 0248–0257.*

Rook F, Gerrits N, Kortstee A, et al. 1998. *Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* ***15****: 253–263.*

Rosa M, Prado C, Podazza G, et al. 2009. *Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. Plant Signaling & Behavior* ***4****: 388–393.*

Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, et al. 2009. *Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO2 efflux. New Phytologist* ***184****: 950–961.*

Ruiz-Labourdette D, Schmitz MF, Pineda FD. ***2013***. *Changes in tree species composition in Mediterranean mountains under climate change: Indicators for conservation planning. Ecological Indicators* ***24****: 310–323.*

Rustad L, Campbell J, Dukes JS, et al. 2012. *Changing Climate, Changing Forests: The Impacts of Climate Change on Forests of the Northeastern United States and Eastern Canada. Newton Square: U.S. Forest Service.*

Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM. ***2003***. *The ―hydrology" of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. Plant, Cell & Environment* ***26****: 1343–1356.*

Sack L, Dietrich EM, Streeter CM, Sanchez-Gomez D, Holbrook NM. ***2008***. *Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***105****: 1567–1572.*

Sack L, Holbrook NM. ***2006***. *Leaf hydraulics. Annual Review of Plant Biology* ***57****: 361–381.*

Sack L, Scoffoni C. ***2013***. *Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. New Phytologist* ***198****: 983–1000.*

Sack L, Scoffoni C, Johnson DM, Buckley TN, Brodribb TJ. ***2015***. *The Anatomical Determinants of Leaf Hydraulic Function In: Hacke U, ed. Functional and Ecological Xylem Anatomy. Cham: Springer International Publishing, 255–271.*

Sack L, Scoffoni C, McKown AD, et al. 2012a. *Developmentally based scaling of leaf venation architecture explains global ecological patterns. Nature Communications* ***3****: 837.*

Sack L, Scoffoni C, McKown AD, et al. 2012b. *Developmentally based scaling of leaf venation architecture explains global ecological patterns. Nature Communications* ***3****: 837.*

Sade Nir, Gallé A, Flexas J, et al. 2014. *Differential tissue-specific expression of NtAQP1 in Arabidopsis thaliana reveals a role for this protein in stomatal and mesophyll conductance of CO2 under standard and salt-stress conditions. Planta* ***239****: 357–366.*

Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M. ***2012***. *Risk-taking plants: Anisohydric behavior as a stress-resistance trait. Plant Signaling & Behavior* ***7****: 767–770.*

Sade N., Shatil-Cohen A, Attia Z, et al. 2014. *The role of plasma membrane aquaporins in regulating the bundle sheath-mesophyll continuum and leaf hydraulics. Plant Physiology* ***166****: 1609–1620.*

Sade N, Vinocur BJ, Diber A, et al. 2009. *Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SlTIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? New Phytologist* ***181****: 651–661.*

Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M. ***2008***. *Tissue and Cell-Specific Localization of Rice Aquaporins and Their Water Transport Activities. Plant and Cell Physiology* ***49****: 30–39.*

Sala A, Piper F, Hoch G. ***2010***. *Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved: Letters. New Phytologist* ***186****: 274–281.*

Salleo S, Lo Gullo MA, Raimondo F, Nardini A. ***2001***. *Vulnerability to cavitation of leaf minor veins: any impact on leaf gas exchange? Plant, Cell and Environment* ***24****: 851–859.*

Samuel D, Kumar TK, Ganesh G, et al. 2000. *Proline inhibits aggregation during protein refolding. Protein Science: A Publication of the Protein Society* ***9****: 344–352.*

Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M*. *2008*.** *Nitric Oxide Reduces Hydrogen Peroxide Accumulation Involved in Water Stress-induced Subcellular Anti-oxidant Defense in Maize Plants. Journal of Integrative Plant Biology* ***50*: 231–243.*

Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C*. *2006*.** *Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. The Biochemical Journal* ***400*: 189–197.*

Sax D, Stachowicz J, Brown J, et al. 2007*.** *Ecological and evolutionary insights from species invasions. Trends in Ecology & Evolution* ***22*: 465–471.*

Scheiner SM, Holt RD*. *2012*.** *The genetics of phenotypic plasticity. X. Variation versus uncertainty: Plasticity, Variation, and Uncertainty. Ecology and Evolution* ***2*: 751–767.*

Schmieder R, Lim Y, Rohwer F, Edwards R*. *2010*.** *TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. BMC Bioinformatics* ***11*: 341.*

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

Scoffoni C, Rawls M, McKown A, Cochard H, Sack L*. *2011*.** *Decline of Leaf Hydraulic Conductance with Dehydration: Relationship to Leaf Size and Venation Architecture. Plant Physiology* ***156*: 832–843.*

Secchi F, Zwieniecki MA*. *2010*.** *Patterns of PIP gene expression in Populus trichocarpa during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP1 aquaporin subfamily as moderators of refilling process: Xylem embolism refilling in poplar: the role of aquaporins. Plant, Cell & Environment* ***33*: 1285–1297.*

Secchi F, Zwieniecki MA*. *2011*.** *Sensing embolism in xylem vessels: the role of sucrose as a trigger for refilling: Sensing embolism in poplar vessels. Plant, Cell & Environment* ***34*: 514–524.*

Secchi F, Zwieniecki MA*. *2013*.** *The physiological response of Populus tremula x alba leaves to the down-regulation of PIP1 aquaporin gene expression under no water stress. Frontiers in Plant Science* ***4*: 507.*

Secchi F, Zwieniecki MA*. *2014*.** *Down-Regulation of Plasma Intrinsic Protein1 Aquaporin in Poplar Trees Is Detrimental to Recovery from Embolism. Plant Physiology* ***164*: 1789–1799.*

Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI*. *2012*.** *Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? FEMS Microbiology Reviews* ***36*: 862–876.*

Seki M, Ishida J, Narusaka M, et al. 2002*.** *Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. Functional & Integrative Genomics* ***2*: 282–291.*

Sellin A*. *1999*.** *Does pre-dawn water potential reflect conditions of equilibrium in plant and soil water status? Acta Oecologica* ***20*: 51–59.*

Serraj R, Sinclair TR*. *2002*.** *Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? Plant, Cell & Environment* ***25*: 333–341.*

Settele J, Scholes R, Betts R, et al. 2014. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change In: Terrestrial and inland water systems. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 271–359.*

Sevanto S. ***2014***. *Phloem transport and drought. Journal of Experimental Botany* ***65****: 1751–1759.*

Sevanto S, Mcdowell NG, Dickman LT, Pangle R, Pockman WT. ***2014***. *How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses: How do trees die? Plant, Cell & Environment* ***37****: 153–161.*

Shackel KA, Lampinen B, Ahmadi H, et al. 1997. *Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. HortTechnology* ***7****: 23–28.*

Shao H-B, Song W-Y, Chu L-Y. ***2008***. *Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. Comptes Rendus Biologies* ***331****: 587–596.*

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. ***2012***. *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany* ***2012****: 1–26.*

Shatil-Cohen A, Attia Z, Moshelion M. ***2011***. *Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA?: Osmotic water permeability of C3 BSCs. The Plant Journal* ***67****: 72–80.*

Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, et al. 2006. *The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. Nature* ***443****: 823–826.*

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. ***2003***. *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biology* ***6****: 410–417.*

Siddiqui ZS, Cho J-I, Kwon T-R, et al. 2014. *Physiological mechanism of drought tolerance in transgenic rice plants expressing Capsicum annuum methionine sulfoxide reductase B2 (CaMsrB2) gene. Acta Physiologiae Plantarum* ***36****: 1143–1153.*

Silim S, Nash R, Reynard D, White B, Schroeder W. ***2009***. *Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (Populus spp.) clones with contrasting drought tolerance. Trees* ***23****: 959–969.*

Simonneau T, Ollat N, Lebon E. ***2014***. *Contrôle de l'état hydrique dans la plante et réponses physiologiques de la vigne à la contrainte hydrique. Innovations Agronomiques* ***38****: 13–32.*

Singh S, Brocker C, Koppaka V, et al. 2013. *Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilicstress. Free Radical Biology and Medicine* ***56****: 89–101.*

Singh LP, Gill SS, Tuteja N. ***2011***. *Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. Plant Signaling & Behavior* ***6****: 175–191.*

Singh Gujjar R, Akhtar M, Rai A, Singh M. ***2014***. *Expression analysis of drought induced genes in wild tomato line (Solanum habrochaites). Current Science* ***107****: 496–502.*

Singh D, Laxmi A*. *2015*.** *Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. Frontiers in Plant Science* ***6*.*

Singh B, Sharma RA*. *2015*.** *Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. 3 Biotech* ***5*: 129–151.*

Singh P, Tiwari A, Singh SP, Asthana RK*. *2013*.** *Proline biosynthesizing enzymes (glutamate 5-kinase and pyrroline-5-carboxylate reductase) from a model cyanobacterium for desiccation tolerance. Physiology and Molecular Biology of Plants* ***19*: 521–528.*

Siwko ME, Marrink SJ, de Vries AH, Kozubek A, Schoot Uiterkamp AJM, Mark AE*. *2007*.** *Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* ***1768*: 198–206.*

Smirnov B*. *1960*.** *The biosynthesis of higher acids from acetate in intact chloroplasts of Spinacea oleracea leaves. Biokhimii* ***25*: 419–426.*

Soto G, Alleva K, Amodeo G, Muschietti J, Ayub ND*. *2012*.** *New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: Orthologous identification and functional transfer is possible. Gene* ***503*: 165–176.*

Soussillane P, D'Alessio C, Paccalet T, et al. 2009*.** *N-glycan trimming by glucosidase II is essential for Arabidopsis development. Glycoconjugate Journal* ***26*: 597–607.*

Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, et al. 2009*.** *Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta* ***230*: 985–1002.*

Sridha S, Wu K*. *2006*.** *Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. The Plant Journal* ***46*: 124–133.*

Stalfelt MG*. *1955*.** *The Stomata as a Hydrophotic Regulator of the Water Deficit of the Plant. Physiologia Plantarum* ***8*: 572–593.*

Steinger T, Roy BA, Stanton ML*. *2003*.** *Evolution in stressful environments II: adaptive value and costs of plasticity in response to low light in Sinapis arvensis. Journal of Evolutionary Biology* ***16*: 313–323.*

***Stocker O*. *1956*.** *Die Abhängigkeit des transpiration von den umweltfaktoren. In: Encyclopedia of plant physiology. Berlin: Springer-Verlag, 436–488.*

Street NR, Skogstrom O, Sjodin A, et al. 2006*.** *The genetics and genomics of the drought response in Populus. Plant Journal* ***48*: 321–341.*

Su X, Chu Y, Li H, et al. 2011*.** *Expression of Multiple Resistance Genes Enhances Tolerance to Environmental Stressors in Transgenic Poplar (Populus × euramericana –Guariento") (Z Liu, Ed.). PLoS ONE* ***6*: e24614.*

Su Z, Ma X, Guo H, et al. 2013*.** *Flower Development under Drought Stress: Morphological and Transcriptomic Analyses Reveal Acute Responses and Long-Term Acclimation in Arabidopsis. The Plant Cell* ***25*: 3785–3807.*

***Sultan SE*. *2000*.** *Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. Trends in Plant Science **5**: 537–542.*

***Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T*. *2011*.** *REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms (C Gibas, Ed.). PLoS ONE **6**: e21800.*

***Surbanovski N, Sargent DJ, Else MA, Simpson DW, Zhang H, Grant OM*. *2013*.** *Expression of Fragaria vesca PIP Aquaporins in Response to Drought Stress: PIP Down-Regulation Correlates with the Decline in Substrate Moisture Content (R Balestrini, Ed.). PLoS ONE **8**: e74945.*

***Surpin M*. *2003*.** *The VTI Family of SNARE Proteins Is Necessary for Plant Viability and Mediates Different Protein Transport Pathways. The Plant Cell Online **15**: 2885–2899.*

***Suttle KB, Thomsen MA, Power ME*. *2007*.** *Species Interactions Reverse Grassland Responses to Changing Climate. Science **315**: 640–642.*

***Suzuki S, Li L, Sun Y-H, Chiang VL*. *2006*.** *The Cellulose Synthase Gene Superfamily and Biochemical Functions of Xylem-Specific Cellulose Synthase-Like Genes in Populus trichocarpa. Plant Physiology **142**: 1233–1245.*

***Swarbreck SM, Lindquist EA, Ackerly DD, Andersen GL*. *2011*.** *Analysis of Leaf and Root Transcriptomes of Soil-Grown Avena barbata Plants. Plant and Cell Physiology **52**: 317–332.*

***Szabados L, Savouré A*. *2010*.** *Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science **15**: 89–97.*

***Tang S, Dong Y, Liang D, et al. 2015*.** *Analysis of the Drought Stress-Responsive Transcriptome of Black Cottonwood (Populus trichocarpa) Using Deep RNA Sequencing. Plant Molecular Biology Reporter **33**: 424–438.*

***Tardieu F, Davies WJ*. *1993*.** *Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. Plant, Cell and Environment **16**: 341–349.*

***Tardieu F, Parent B, Caldeira CF, Welcker C*. *2014*.** *Genetic and Physiological Controls of Growth under Water Deficit. Plant Physiology **164**: 1628–1635.*

***Tardieu F, Simonneau T*. *1998*.** *Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. Journal of Experimental Botany **49**: 419–432.*

***Taylor G*. *2002*.** *Populus: Arabidopsis for Forestry. Do we need a model tree? Annals of Botany **90**: 681–689.*

***Taylor DR, Aarssen LW*. *1988*.** *An Interpretation of Phenotypic Plasticity in Agropyron repens (Graminae). Botanical Society of America **75**: 401–413.*

***Terashima I*. *1992*.** *Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. Photosynthesis Research **31**: 195–212.*

Thévenaz P, Unser M*. *2007*. *User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. Microscopy Research and Technique* ***70*: 135–146.*

Thomas DS, Eamus D*. *1999*. *The influence of predawn leaf water potential on stomatal responses to atmospheric water content at constant Ci and on stem hydraulic conductance and foliar ABA concentrations. Journal of Experimental Botany* ***50*: 243–251.*

***Thomas F, Lefevre T, Raymond M*. *2016*. *Biologie évolutive. Louvain-la-Neuve: De Boeck supérieur.*

Timperio AM, Egidi MG, Zolla L*. *2008*. *Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics* ***71*: 391–411.*

Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K*. *2015*. *Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. Frontiers in Plant Science* ***6*.*

Toillon J, Rollin B, Dallé E, et al. 2013*. *Variability and plasticity of productivity, water-use efficiency, and nitrogen exportation rate in Salix short rotation coppice. Biomass and Bioenergy* ***56*: 392–404.*

Tolba S, Egan S, Kallifidas D, Wellington EMH*. *2002*. *Distribution of streptomycin resistance and biosynthesis genes in streptomycetes recovered from di¡erent soil sites. FEMS Microbiology Ecology* ***42*: 269–276.*

Tomlinson PB*. *1983*. *Tree architecture. American Scientist* ***71*: 141–149.*

Törnroth-Horsefield S, Hedfalk K, Fischer G, Lindkvist-Petersson K, Neutze R*. *2010*. *Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. FEBS Letters* ***584*: 2580–2588.*

Tosens T, Niinemets üLo, Vislap V, Eichelmann H, Castro DíEz P*. *2012*. *Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in Populus tremula: how structure constrains function: Structural limitations to photosynthesis. Plant, Cell & Environment* ***35*: 839–856.*

Townsley BT, Sinha NR*. *2012*. *A New Development: Evolving Concepts in Leaf Ontogeny. Annual Review of Plant Biology* ***63*: 535–562.*

Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, et al. 2004*. *Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. The Plant Cell* ***16*: 2481–2498.*

Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, et al. 2006*. *Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis: ZFHD and NAC in drought stress response. The Plant Journal* ***49*: 46–63.*

Traverso JA, Micalella C, Martinez A, et al. 2013*. *Roles of N-Terminal Fatty Acid Acylations in Membrane Compartment Partitioning: Arabidopsis h-Type Thioredoxins as a Case Study. The Plant Cell* ***25*: 1056–1077.*

***Trifiló P, Raimondo F, Savi T, Lo Gullo MA, Nardini A*. *2016*. *The contribution of vascular and extra-vascular water pathways to drought-induced decline of leaf hydraulic conductance. Journal of Experimental Botany: erw268.*

***True JR, Haag ES*. *2001*. *Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. Evolution & Development **3**: 109–119.*

***Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, et al. 2006*. *The Genome of Black Cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). Science **313**: 1596–1604.*

***Tuskan GA, DiFazio SP, Teichmann T*. *2004*. *Poplar genomics is getting popular: the impact of the poplar genome project on tree research. Plant Biology **6**: 2–4.*

***Tuteja N*. *2007*. *Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. Plant Signaling & Behavior **2**: 135–138.*

***Tuteja N, Tran NQ, Dang HQ, Tuteja R*. *2011*. *Plant MCM proteins: role in DNA replication and beyond. Plant Molecular Biology **77**: 537–545.*

***Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H*. *2002*. *Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. Plant, Cell & Environment **25**: 173–194.*

***Tyree MT, Ewers FW*. *1991*. *The hydraulic architecture of trees and other woody plants. New Phytologist **119**: 345–360.*

***Tyree MT, Sperry JS*. *1988*. *Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? : answers from a model. Plant Physiology **88**: 574–580.*

***Tyree MT, Vargas G, Engelbrecht BMJ, Kursar TA*. *2002*. *Drought until death do us part: a case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree, Licania platypus (Hemsl.) Fritsch. Journal of Experimental Botany **53**: 2239–2247.*

***Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH*. *2004*. *Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. Cell Structure and Function **29**: 49–65.*

***Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K*. *2000*. *Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 11632–11637.*

***Urano K, Maruyama K, Ogata Y, et al. 2009*. *Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology **57**: 1065–1078.*

***Valladares F, Arrieta S, Aranda I, et al. 2005*. *Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of Ilex aquifolium in continental Mediterranean sites. Tree Physiology **25**: 1041–1052.*

***Valladares F, Gianoli E, Gómez JM*. *2007*. *Ecological limits to plant phenotypic plasticity. New Phytologist **176**: 749–763.*

***Valladares F, Martinez-Ferri E, Balaguer L, Perez-Corona E, Manrique E*. *2000*. *Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy?: RESEARCH Plastic leaf response to light and nutrients in two oaks. New Phytologist **148**: 79–91.*

***Valladares F, Niinemets Ü*. *2008*. *Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **39**: 237–257.*

***Valladares F, Sanchez-Gomez D, Zavala MA*. *2006*. *Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. Journal of Ecology **94**: 1103–1116.*

***Van Buskirk J, Steiner UK*. *2009*. *The fitness costs of developmental canalization and plasticity. Journal of Evolutionary Biology **22**: 852–860.*

***Van der Putten WH, Macel M, Visser ME*. *2010*. *Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **365**: 2025–2034.*

***Van Kleunen M, Fischer M*. *2005*. *Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants: Research review. New Phytologist **166**: 49–60.*

***Vanlerberghe G*. *2013*. *Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. International Journal of Molecular Sciences **14**: 6805–6847.*

***Verhertbruggen Y, Yin L, Oikawa A, Scheller HV*. *2011*. *Mannan synthase activity in the CSLD family. Plant Signaling & Behavior **6**: 1620–1623.*

***Verslues PE, Sharma S*. *2010*. *Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. The Arabidopsis Book **8**: e0140.*

***Viart M*. *1992*. *Présentation du Catalogue International des Cultivars de Peupliers In: Zaragoza, Spain, FO:CIP:NR/92/1, .*

***Vigani G, Zocchi G, Bashir K, Philippar K, Briat JF*. *2013*. *Cellular iron homeostasis and metabolism in plant. Frontiers in Plant Science **4**.*

***Viger M, Smith HK, Cohen D, et al. 2016*. *Adaptive mechanisms and genomic plasticity for drought tolerance identified in European black poplar (Populus nigra L.). Tree Physiology **0**: 1–20.*

***Vijn I, Smeekens S*. *1999*. *Fructan: more than a reserve carbohydrate? Plant Physiology **120**: 351–360.*

***Villar M*. *2011*. *Conservation des ressources génétiques du peuplier noir dans son habitat : bases biologiques, génétiques et écologiques.*

***Villar M, Forestier O*. *2009*. *Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? Revue Forestière Française LXI-5: 457–466.*

Vlachonasios KE, Thomashow MF, Triezenberg SJ*. *2003*.** *Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. The Plant Cell* ***15*: 626–638.*

Wagner GJ*. *2004*.** *New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. Annals of Botany* ***93*: 3–11.*

Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S*. *2016*.** *Drought-Responsive Mechanisms in Plant Leaves Revealed by Proteomics. International Journal of Molecular Sciences* ***17*: 1706.*

Wang Z, Gerstein M, Snyder M*. *2009*.** *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics* ***10*: 57–63.*

Wang C, Hu H, Qin X, et al. 2016*.** *Reconstitution of CO_2 Regulation of SLAC1 Anion Channel and Function of CO_2-Permeable PIP2;1 Aquaporin as Carbonic Anhydrase4 Interactor. The Plant Cell* ***28*: 568–582.*

Wang T, McFarlane HE, Persson S*. *2016*.** *The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. Journal of Experimental Botany* ***67*: 543–552.*

Wang S, Ouyang L, Ju X, Zhang L, Zhang Q, Li Y*. *2014*.** *Survey of Plant Drought-Resistance Promoting Bacteria from Populus euphratica Tree Living in Arid Area. Indian Journal of Microbiology* ***54*: 419–426.*

Wang W, Vinocur B, Altman A*. *2003*.** *Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta* ***218*: 1–14.*

Ward JM, Mäser P, Schroeder JI*. *2009*.** *Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. Annual Review of Physiology* ***71*: 59–82.*

Warnecke D, Heinz E*. *2003*.** *Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. Cellular and Molecular Life Sciences* ***60*: 919–941.*

Warren CR*. *2008*.** *Soil water deficits decrease the internal conductance to CO2 transfer but atmospheric water deficits do not. Journal of Experimental Botany* ***59*: 327–334.*

***Weatherley PE*. *1970*.** *Some Aspects of Water Relations In: Advances in Botanical Research. Elsevier, 171–206.*

Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE*. *2004*.** *Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* ***37*: 877–888.*

Weber APM, Weber KL, Carr K, Wilkerson C, Ohlrogge JB*. *2007*.** *Sampling the Arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. Plant Physiology* ***144*: 32–42.*

Welch*. *1984*.** *A Technique for High-Performance Data Compression. Computer* ***17*: 8–19.*

Wheeler JK, Huggett BA, Tofte AN, Rockwell FE, Holbrook NM*. *2013*.** *Cutting xylem under tension or supersaturated with gas can generate PLC and the appearance of rapid recovery from embolism: Sampling induced embolism. Plant, Cell & Environment* ***36*: 1938-49.*

Wilkins O, Braeutigam K, Campbell MM*. *2010*.** *Time of day shapes Arabidopsis drought transcriptomes. Plant Journal* ***63*: 715–727.*

Wilkins O, Waldron L, Nahal H, Provart NJ, Campbell MM*. *2009*.** *Genotype and time of day shape the Populus drought response. The Plant Journal* ***60*: 703–715.*

Willis CG, Ruhfel B, Primack RB, Miller-Rushing AJ, Davis CC*. *2008*.** *Phylogenetic patterns of species loss in Thoreau's woods are driven by climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***105*: 17029–17033.*

Wilson R, D'Arrigo R, Buckley B, et al. 2007*.** *A matter of divergence: Tracking recent warming at hemispheric scales using tree ring data. Journal of Geophysical Research* ***112*.*

Wisz MS, Pottier J, Kissling WD, et al. 2013*.** *The role of biotic interactions in shaping distributions and realised assemblages of species: implications for species distribution modelling. Biological Reviews* ***88*: 15–30.*

Woltereck R*. *1909*.** *Weitere experimentelle untersüchungen über artveränderung, speziell über das wesen quantitativer artunterschede bei daphniden. Verhandlungen der Deutschen Zooligischen Gesllschaft* ***19*: 110–172.*

Worrall JJ, Rehfeldt GE, Hamann A, et al. 2013*.** *Recent declines of Populus tremuloides in North America linked to climate. Forest Ecology and Management* ***299*: 35–51.*

Wu R, Hinckley TM*. *2001*.** *Phenotypic plasticity of sylleptic branching: genetic design of tree architecture. Critical Reviews in Plant Sciences* ***20*: 467–485.*

Wylie RB*. *1952*.** *The Bundle Sheath Extension in Leaves of Dicotyledons. American Journal of Botany* ***39*: 645–651.*

Xiao S, Chye M-L*. *2011*.** *New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. Progress in Lipid Research* ***50*: 141–151.*

Xu Y, Hu W, Liu J, et al. 2014*.** *A banana aquaporin gene, MaPIP1;1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. BMC Plant Biology* ***14*: 59.*

Xu Z, Zhou G, Shimizu H*. *2010*.** *Plant responses to drought and rewatering. Plant Signaling & Behavior* ***5*: 649–654.*

Xue L-J, Frost CJ, Tsai C-J, Harding SA*. *2016*.** *Drought response transcriptomes are altered in poplar with reduced tonoplast sucrose transporter expression. Scientific Reports* ***6*: 33655.*

Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C*. *2008*.** *Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. Journal of Experimental Botany* ***60*: 339–349.*

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K*. *1993*.** *Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. Molecular & general genetics: MGG* ***236*: 331–340.*

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K*. *2006*.** *Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology* ***57*: 781–803.*

Yan J, Tsuichihara N, Etoh T, Iwai S*. *2007*.** *Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. Plant, Cell & Environment* ***30*: 1320–1325.*

Yaneff A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta LI, Amodeo G*. *2014*.** *Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***111*: 231–236.*

Yang S-D, Seo PJ, Yoon H-K, Park C-M*. *2011*.** *The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. The Plant Cell* ***23*: 2155–2168.*

Yani A, Pauly G, Faye M, Salin F, Gleizes M*. *1993*.** *The effect of a long-term water stress on the metabolism and emission of terpenes of the foliage of Cupressus sempervirens. Plant, Cell and Environment* ***16*: 975–981.*

Ye Q, Wiera B, Steudle E*. *2004*.** *A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in Chara internodes by high concentration. Journal of Experimental Botany* ***55*: 449–461.*

Yee D, Goring DR*. *2009*.** *The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. Journal of Experimental Botany* ***60*: 1109–1121.*

Yi F, Chen J, Yu J*. *2015*.** *Global analysis of uncapped mRNA changes under drought stress and microRNA-dependent endonucleolytic cleavages in foxtail millet. BMC Plant Biology* ***15*.*

Yi Z, Zheng L, Guo P, Bi J*. *2013*.** *Distribution of α-, β-, γ-, and δ-hexachlorocyclohexane in soil–plant–air system in a tea garden. Ecotoxicology and Environmental Safety* ***91*: 156–161.*

Yoon S-K, Park E-J, Choi Y-I, et al. 2014*.** *Response to drought and salt stress in leaves of poplar (Populus alba × Populus glandulosa): Expression profiling by oligonucleotide microarray analysis. Plant Physiology and Biochemistry* ***84*: 158–168.*

Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, et al. 2015*.** *Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. Plant, Cell & Environment* ***38*: 35–49.*

Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, et al. 2002*.** *ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. Plant & Cell Physiology* ***43*: 1473–1483.*

You J, Zong W, Li Xiaokai, et al. 2013*.** *The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. Journal of Experimental Botany* ***64*: 569–583.*

Zentner GE, Henikoff S*. *2013*.** *Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. Nature Structural & Molecular Biology* ***20*: 259–266.*

Zhai H, Wang F, Si Z, et al. 2016*. A myo -inositol-1-phosphate synthase gene, IbMIPS1 , enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. Plant Biotechnology Journal* ***14****: 592–602.*

Zhang W, Chu Y, Ding C, et al. 2014*. Transcriptome sequencing of transgenic poplar (Populus × euramericana ―Guariento") expressing multiple resistance genes. BMC Genetics* ***15****: S7.*

Zhang L, Zhang H, Liu P, Hao H, Jin JB, Lin J*. *2011*.** *Arabidopsis R-SNARE Proteins VAMP721 and VAMP722 Are Required for Cell Plate Formation (H Yang, Ed.). PLoS ONE* ***6*: e26129.*

***Zhao M, Tan H-T, Scharwies J, Levin K, Evans JR, Tyerman SD*. *2016*.** *Association between water and carbon dioxide transport in leaf plasma membranes: assessing the role of aquaporins.: Water and carbon dioxide transport via aquaporins. Plant, Cell & Environment.*

Zheng L, Liu G, Meng X, et al. 2013*. A WRKY gene from Tamarix hispida, ThWRKY4, mediates abiotic stress responses by modulating reactive oxygen species and expression of stress-responsive genes. Plant Molecular Biology* ***82****: 303–320.*

Zhou S, Li M, Guan Q, et al. 2015*. Physiological and proteome analysis suggest critical roles for the photosynthetic system for high water-use efficiency under drought stress in Malus. Plant Science* ***236****: 44–60.*

Zhu J-K*. *2002*.** *Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology* ***53*: 247–273.*

Zhu X, Xiong L*. *2013*.** *Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences* ***110*: 17790–17795.*

Zimmermann Martin H. 1983*. Xylem Structure and the Ascent of Sap. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.*

Zsögön A, Alves Negrini AC, Peres LEP, Nguyen HT, Ball MC*. *2014*.** *A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (Solanum lycopersicum). New Phytologist* ***205*: 618–626.*

Zwieniecki MA, Boyce CK*. *2014*.** *Evolution of a unique anatomical precision in angiosperm leaf venation lifts constraints on vascular plant ecology. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* ***281*: 20132829.*

Zwieniecki M, Boyce C, Holbrook N*. *2004*.** *Functional design space of single-veined leaves: Role of tissue hydraulic properties in constraining leaf size and shape. Annals of Botany* ***94*: 507–513.*

Zwieniecki MA, Holbrook NM*. *1998*. *Diurnal variation in xylem hydraulic conductivity in white ash (Fraxinus americana L.), red maple (Acer rubrum L.) and red spruce (Picea rubens Sarg.). Plant, Cell and Environment* ***21*: 1173–1180.*

Valorisation des travaux scientifiques

Article accepté dans une revue internationale

Integrated drought responses of black poplar: How important is phenotypic plasticity? Marie Garavillon-Tournayre, Aurélie Gousset-Dupont, Florian Gautier, Pierrick Benoit, Pierre Conchon, Romain Souchal, David Lopez, Gilles Pétel, Jean-Stéphane Venisse, Catherine Bastien, Philippe Label and Boris Fumanal. 2017. Physiologia Plantarum.

Articles en préparation en vue d'une soumission dans une revue internationale

Black poplar response to drought: the role of transcriptional plasticity**.** Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont, Romain De Oliveira, Pierrick Benoit, Benjamin Alary, Gilles Petel, Jean-Stéphane Venisse, Philippe Label.

Insight into leaf tissue specific transcriptional modulations in drought conditions. Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Venisse Jean-Stéphane, Philippe Label Aurélie Gousset-Dupont.

Communications par affiche

Whole transcriptome sequencing and ecophysiological traits to qualify drought responses in *Populus nigra* genotypes. Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont, Romain De Oliveira, Pierrick Benoit, Benjamin Alary, Gilles Petel, Jean-Stéphane Venisse, Philippe Label. Plant Signaling and Behaviors. 2015. Paris, France.

Transcriptome and ecophysiological data of *Populus nigra* genotypes during drought stress. Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont, Romain De Oliveira, Pierrick Benoit, Benjamin Alary, Gilles Petel, Jean-Stéphane Venisse, Philippe Label. JOBIM, Open Days in Biology, Informatics and Mathematics. 2015. Clermont-Ferrand, France.

Valorisation des travaux scientifiques (suite)

Communications par affiche (suite)

Phenotypic and transcriptional plasticities in response to drought in black poplar. Marie Garavillon-Tournayre, Boris Fumanal, Aurélie Gousset-Dupont, Romain De Oliveira, Pierrick Benoit, Benjamin Alary, Gilles Petel, Jean-Stéphane Venisse, Philippe Label. Plant Biology Europe EPSO/FESPB Congress. 2016. Prague, Czech Republic.

Communication orale dans des colloques nationaux

Impact of light acclimation on temperate forest trees hydraulics. Marie Garavillon-Tournayre, Aurélie Gousset-Dupont. Xylem group meeting- 2014.

Article de communication grand publique

Phenotypic and transcriptional plasticities of black poplar drought responses. 2016. Auvergne Science.

Abstract

In temperate climates, climate change will result in an increase of the frequency and intensity of droughts. Among the factors influencing the species survival in fluctuating environment, trait responses plasticity seems to be a major asset. This thesis has focused on the integrated study of physiological and transcriptional responses of black poplar responding to a progressive water deficit until a severe level. For an overall analysis, plant phenotypic traits responses plasticity and, for the first time, plasticity of the leaf genes expression has been estimated. Different scales of study were taken into account: genotypes from different populations, clones of the same genotype and leaf structures (midrib *versus* leaf blade). A continuum of phenotypic responses to severe water deficit was identified allowing classifying the majority of the genotypes as sensitive with only one tolerant genotype, maintaining its foliar development, preserving its mature leaves and limiting hydraulic tension. The leaf blade transcriptome was deeply remodeled under severe drought (41% differentially expressed transcripts) and exhibited functions related to the modification of the membrane composition, maintenance of cellular homeostasis and detoxication. Transcripts related to intra- and extra-cellular transport and water flows (by aquaporins) were also highly regulated and associated with integrity and cellular hydration functions of the leaf blade. The transcriptome modulation was in part specific to the midrib compared to the leaf blade. The 958 specifically regulated transcripts of the midrib indicated up-regulation of genes implied in glyoxylate and carbohydrates metabolisms and down-regulation of genes involved in intra- and extra-cellular transport. In consequence, these modifications may favor sugar accumulation in the midrib and could force the sap flow and limit embolism. The estimated mean phenotypic and transcriptional plasticities were different between genotypes. The number of leaves and the leaf water potential were the two traits allowing discriminating statistically the genotypes by their plasticity. The plasticity level of some genes expression was also specific to genotypes: transcriptional plasticity was high concerning genes involved in carbon fixation and transport of secondary messengers for the genotype, which on average was the least plastic. All these results allowed concluding that the most drought-tolerant genotype possessed the lowest degrees of phenotypic and transcriptional plasticities. Conversely, the most sensitive genotypes hold high phenotypic and transcriptional plasticities. Finally, the regulation of the plasticity degree would depend on both preserved mechanisms and others acquired by the genotypes.

Keywords: drought, black poplar, ecophysiology, transcriptome, phenotypic plasticity, transcriptional plasticity, drought responses strategies

Résumé

En climat tempéré, le changement climatique aura pour conséquence une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses. Parmi les facteurs influençant la survie des espèces à cet environnement fluctuant, la plasticité d'ajustement des traits de réponse semble constituer un atout majeur. Ce travail de thèse a étudié de façon intégrée la réponse physiologique et transcriptionnelle du peuplier noir à une carence hydrique progressive jusqu'à un niveau sévère. Dans le cadre d'une analyse globale, la plasticité des traits de réponse physiologiques de la plante et, pour la première fois, celle de l'expression des gènes foliaires a été estimée. Différentes échelles d'étude ont été prise en compte : les génotypes issus de populations différentes, les clones d'un même génotype et les structures de la feuille (nervure principale *versus* limbe). Un continuum de réponses phénotypiques au déficit hydrique sévère a été identifié permettant de classer la majorité des génotypes étudiés comme évitants avec un seul génotype tolérant, maintenant son développement foliaire, conservant ses feuilles matures et limitant la tension hydrique. Le transcriptome du limbe était profondément remodelé en réponse au déficit hydrique maximal (41% des transcrits différentiellement exprimés) et présentait des fonctions en lien avec la modification de la composition membranaire, le maintien de l'homéostasie cellulaire et la détoxication. L'expression des gènes liés au transport intra- et extra-cellulaire et aux flux d'eau (par les aquaporines) était également fortement régulée. Ces gènes étaient associés aux fonctions de maintien de l'intégrité et de l'hydratation cellulaire du limbe. La modulation du transcriptome était partiellement spécifique de la nervure principale par rapport au limbe. Les 958 transcrits spécifiquement régulés de la nervure principale indiquaient une sur-expression des gènes liés aux métabolismes du glyoxylate et des carbohydrates, et une sous-expression des gènes liés au transport intra- et extra-cellulaire. Ceci pourrait favoriser une accumulation de sucres dans la nervure principale, ce qui permettrait de maintenir les flux de sève et de limiter l'embolie. Les plasticités phénotypiques et transcriptionnelles moyennes calculées étaient différentes entre génotypes. Le nombre de feuilles et le potentiel hydrique foliaire étaient les deux traits permettant de discriminer statistiquement les génotypes par leur plasticité. Le niveau de plasticité de certains transcrits était également spécifique des génotypes : la plasticité transcriptionnelle était forte pour les gènes impliqués dans la fixation du carbone et le transport des messagers secondaires pour le génotype, qui en moyenne, était le moins plastique. L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que le génotype le plus tolérant à la sécheresse possédait les plus faibles degrés de plasticités phénotypiques et transcriptionnelles. A l'inverse, les génotypes les plus sensibles détenaient des plasticités phénotypiques et transcriptionnelles plus fortes. Enfin, la régulation du degré de plasticité dépendrait à la fois de mécanismes conservés et d'autres acquis par les génotypes.

Mots clés : sécheresse, peuplier noir, écophysiologie, transcriptome, plasticité phénotypique, plasticité transcriptionnelle, stratégie de réponse au stress